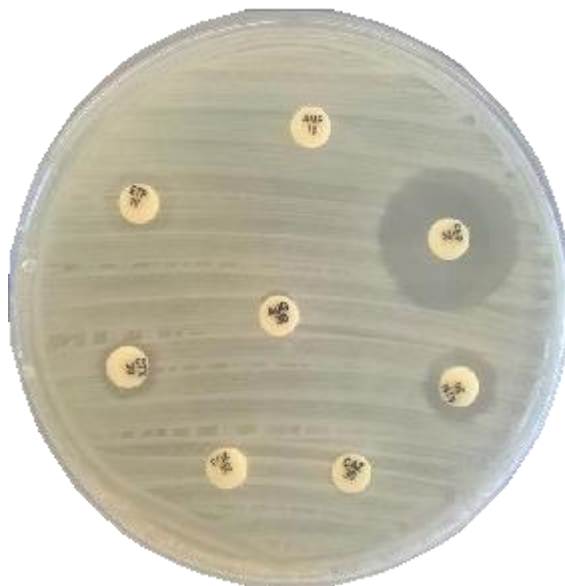


**TÂNIA ANDREIA SILVA FREIRE**

**Águas não tratadas no Norte de Portugal**  
**Qualidade microbiológica e Resistência aos antibióticos**



**Porto**  
**setembro 2015**



**TÂNIA ANDREIA SILVA FREIRE**

**Águas não tratadas no Norte de Portugal**  
**Qualidade microbiológica e Resistência aos antibióticos**

Dissertação do 2º Ciclo de estudos do Curso Controlo de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, conducente ao grau de Mestre em Controlo de Qualidade

Orientador: Prof . Dra Helena Ferreira

**Porto**  
**setembro 2015**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## **Agradecimentos**

Apesar de serem poucas as palavras, deixo um profundo agradecimento a todos os que colaboraram na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Helena Neto Ferreira de Sousa pelo apoio, disponibilidade, incentivo, estímulo, ajuda, críticas e sugestões. Obrigada por todo o carinho e compreensão ao longo destes 2 anos.

Ao Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por ter disponibilizado materiais e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

A todo o pessoal do laboratório por todas as trocas de ideias e palavras de incentivo trocadas.

À minha mãe, por todo o apoio, carinho e palavras de incentivo que me ajudaram principalmente quando as coisas estavam mais complicadas.

A todos um enorme OBRIGADA.

## Abreviaturas

**AK** – Amicacina

**AML** – Ampicilina

**AOX** – Halogenetos Orgânicos

**ATCC** – American Type Culture Collection

**ATM** – Aztreonam

**AUG** – Amoxicilina-Ácido Clavulânico

**C** – Cloranfenicol

**CAZ** – Ceftazidima

**CBc** – Complexo *Burkholderia cepacia*

**CI** – Controlo de Inspeção

**CIM** – Método de Inativação de Carbapenemos

**CIP** – Ciprofloxacina

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CN** – Gentamicina

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**CPRG** - clorofenil-β-galactopiranosídeo

**CR<sub>1</sub>** - Controlo de Rotina 1

**CR<sub>2</sub>** - Controlo de Rotina 2

**CTX** – Cefotaxima

**dNTP's** – Desoxirribonucleotídeos

**DOR**– Doripenemo

***E. Coli*** - *Escherichia Coli*

**ERSAR** - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos

**ETP** – Ertapenemo

**ESBLs** – Beta-lactamases de espectro alargado

**ETAR** - Estação de Tratamento de Águas Residuais

**EUCAST**: *European Society of clinical Microbiology and infectious Diseases*

**F** – Nitrofurantoína

**FAO** - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

**FEP** – Cefepime

**FOS** – Fosfomicina

**FOX** – Cefoxitina

**H<sub>2</sub>O** – Água

**IBM/SPP** – International business machines/Statistical Package for the Social Sciences

**IMI** – Imipenemo

**IPCC** – Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas  
**IRC** - Insuficiência Renal Crônica  
**KPC** – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
**MRP** – Meropenemo  
**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio  
**MLB** - Metallo-β-lactamases  
**MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina  
**MUG** - substrato 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo  
**NAL** – Ácido nalidíxico  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**ONPG** - orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo  
**ONU** – Organização das Nações Unidas  
**PBPs** – Alteração do local de ligação das proteínas ligadoras de penicilina  
**PCR** – Reação da polimerase em cadeia  
**PEAASAR** - Plano Estratégico de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais  
**POP** – Poluentes Orgânicos Persistentes  
**PRP** - *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina  
**SXT** – Trimetoprim+sulfametoxazol  
**TAE** – Tampão Tris-Acetato-EDTA  
**TE** – Tetraciclina  
**TGC** – Tigeciclina  
**TOB** – Tobramicina  
**TSA** – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colônias  
**UV** – Ultravioleta  
**VRE** – *Enterococcus* resistentes à vancomicina

## Resumo

O abastecimento público de água é uma preocupação crescente em termos de saúde pública, devido à escassez e deterioração da qualidade dos recursos hídricos. Água não tratada pode ser imprópria para consumo humano, pode conter microrganismos patogénicos ou produtos químicos, capazes de causar doenças, designadas de doenças de veiculação hídrica <sup>1, 21, 2</sup>. Os Coliformes são microrganismos indicadores de contaminação fecal, sendo importantes indicadores da qualidade e potabilidade da água. Estes microrganismos têm vindo a desenvolver mecanismos de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, classe antibiótica mais utilizada, nomeadamente produção de  $\beta$ -lactamases. Este problema da resistência bacteriana tem aumentado dramaticamente, colocando a população num risco emergente de saúde pública <sup>33</sup>.

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de resistências aos antibióticos em bacilos Gram-negativos presentes em amostras de água para consumo humano, não tratadas, do Norte de Portugal.

Foram analisadas 42 amostras de água para consumo humano não tratadas, colhidas a partir de diferentes locais: poços (47,62%), fontanários (38,10%) e minas (14,29%). A colheita de amostras de água foi realizada de acordo com a recomendação ERSAR 03/2010 <sup>121</sup>. As amostras de água foram analisadas pelo método de filtração por membrana, sendo esta posteriormente colocada em meio de cultura de MacConkey e meio de cultura de MacConkey com ampicilina. As bactérias cujo crescimento foi observado em meio de MacConkey com ampicilina foram selecionadas para a realização de antibiograma. Os halos de inibição de crescimento presentes no antibiograma foram avaliados de acordo com *CLSI* e a identificação, das bactérias resistentes, foi realizada através de galerias API 20 E, ID 32 GN e meio *BD Chromagar Orientation*. Todos os antibiogramas que apresentassem indicações da possível presença de Beta-lactamases, eram submetidos à realização de testes fenotípicos e quando positivos, confirmados através de métodos moleculares. Além disso, os isolados que apresentassem resistência aos carbapenemos eram submetidos à pesquisa de carbapenemases através de métodos moleculares.

Foram obtidos trinta e um isolados resistentes aos antibióticos, dos quais 18 eram fermentadores da lactose e 13 eram não fermentadores da lactose.

A presença de *Shigella*, bactéria patogénica para o ser humano, num fontanário constitui um alerta para os riscos desconhecidos que a população tem quando consome águas não tratadas.

Foi também identificada *Pseudomonas fluorescens* num poço, que tem uma enorme relevância dada a resistência demonstrada aos carbapenemos.

*Stenotrophomonas maltophilia* é um microrganismo patogénico oportunista multirresistente e foi encontrado em poços e minas de regiões diferentes.

*Klebsiella pneumoniae*, além de ser uma bactéria patogénica para os seres humanos e por si só problemática por estar presente numa água para consumo humano (poço), apresenta multirresistência aos antibióticos, incluindo aos carbapenemos.

Foram também isoladas 4 *E.coli* de dois fontanários (Valongo e Paredes), poços e minas (Vizela). Todos apresentavam elevada carga microbiana, sobretudo o fontanário de Valongo, e o poço e mina de Vizela, pois apresentavam quantidade de não coliformes >300 UFC/100 ml, sugestivo de contaminação ambiental. A presença de *E.coli*, sendo um indicador de contaminação fecal utilizado no decreto-lei 306/2007 para estabelecer a potabilidade da água, indica que esta se encontra imprópria para consumo.

*Burkholderia cepacia* 19, isolado encontrado num poço em Paços de Ferreira que apresentava o UFC/100 ml de coliformes, ou seja, segundo o decreto-lei 306/2007, esta água encontra-se própria para consumo, porém a presença deste isolado é importante devido à resistência apresentada e sendo relevante principalmente em unidades de cuidados de saúde.

No que diz respeito à análise microbiológica fica notório que as águas não tratadas apresentam uma elevada carga microbiana, sobretudo de microrganismos não coliformes. Além disso, no que respeita a este trabalho, as amostras da zona de Lousada foram as mais relevantes, pois os isolados destas águas apresentaram mais resistências e do ponto de vista de saúde pública mais preocupantes.

Em suma, com este trabalho foram detetados isolados de bactérias Gram-negativas não fermentadoras da lactose resistentes aos antibióticos que não são contemplados como indicadores da qualidade da água, mas que podem ser relevantes em termos de segurança da água, visto que a sua presença no meio ambiente pode levar à criação de reservatórios de genes de resistência bacteriana e posterior colonização intestinal da população que consome águas não tratadas para consumo humano. Fica também evidente que existe uma elevada disseminação das resistências neste ambiente, sendo preocupante do ponto de vista da saúde pública.

**Palavras-chave:** Águas impróprias para consumo; Bacilos Gram-negativos; Beta-lactâmicos; Multirresistência aos antimicrobianos; Beta-lactamases



## Abstract

The public water supply is a growing concern in terms of public health, due to the scarcity and decreasing quality of water resources. Untreated water can be improper for human consumption, may contain pathogenic microorganisms or chemicals, capable of causing waterborne diseases <sup>1, 21, 2</sup> Coliforms, microorganisms from fecal contamination are the main biological indicators of concern in terms of water quality. These microorganisms have been developing resistance mechanisms to antibiotics, such as to  $\beta$ -lactams, one of the most widely used antibiotic classes. This bacterial resistance problem has increased dramatically, putting the general population in serious health risk.

Our work aimed to verify the presence of antibiotic resistance in gram-negative bacilli present in untreated drinking water <sup>33</sup>.

A total of 42 water samples used in this study were collected from different locations: wells (47.62%), fountains (38.10%) and mines (14.29%). The water sample collection was performed according to the ERSAR recommendation 03/2010 <sup>121</sup>. Water samples were analyzed by the membrane filtration method on MacConkey agar and MacConkey agar with ampicillin. Representatives of different colony morphologies were tested for antimicrobial susceptibility, according to CLSI. Identification of resistant bacteria was performed by API 20 E, ID 32 GN and BD Chromagar Orientation Medium.

Thirty one antibiotic resistant isolates were obtained, of which 18 were lactose fermentative and 13 non-fermentative.

The presence of *Shigella* spp. in a fountain water sample alerts for unknown risks of human consumption of this kind of waters.

It was also identified *Pseudomonas fluorescens* in a well, which has relevance given the resistance shown to carbapenems.

*Stenotrophomonas maltophilia* a multidrug resistant opportunistic pathogen was found in wells and shafts of different regions.

*Klebsiella pneumoniae*, in addition of being a pathogenic bacteria to human beings by itself represents a problem in drinking water (well), it shows multidrug resistance to antibiotics, including carbapenems.

Four *E.coli* were isolated from two fountains (Valongo and Paredes), wells and mines (Vizela). All had high microbial load, especially the fountain of Valongo, and the well and Vizela mine, had non-coliforms > 300 UFC / 100 ml, suggesting environmental contamination. The presence of *E. coli*, being an indicator of faecal contamination used in the legislation to establish the potability of water, indicates that it is inadequate for consumption.

*Burkholderia cepacia* 19, found in an isolated well in Paços de Ferreira had 0 UFC/100 ml of coliforms. Although, according to this finding, water is adequate for consumption, the presence of this isolate is important because of the resistance presented being especially relevant in health care facilities.

Regarding the microbiological analysis is apparent that the untreated water does not have a high microbial load, especially non-coliform microorganisms. Furthermore, regarding this work, samples of Lousada were relevant, because these isolates exhibited relevant antimicrobial resistance.

This work found antibiotic resistant isolates of lactose non-fermenters that are not considered as indicators of water quality but can be relevant in terms of water safety, creating reservoirs of bacterial resistance genes and antibiotic resistant bacteria able of intestinal colonization of the population that use these sources of untreated water. It is also evident that there is a high spread of resistance in the water environment, worrying from the point of view of public health.

**Keywords:** unsafe drinking water; Gram-negative bacilli;  $\beta$ -lactam antibiotics; Antibacterial multidrug resistance;  $\beta$ -lactamases

# Índice

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. A ÁGUA.....	2
1.1. Águas para consumo humano .....	2
1.2. Águas tratadas e não tratadas .....	3
1.3. A problemática de falta de água .....	4
1.4. Legislação em vigor .....	5
1.5. Destino de águas usadas.....	12
1.6. A Problemática das águas impróprias para consumo .....	13
1.7. Flora bacteriana autóctone da água .....	16
1.8. Bactérias encontradas na água .....	16
1.8.1. <i>Enterobacteriaceae</i> .....	16
1.8.2. <i>Pseudomonadaceae</i> .....	20
1.8.3. <i>Xanthomonadaceae</i> .....	21
1.8.4. <i>Burkholderiaceae</i> .....	21
1.8.5. <i>Flavobacterium</i> .....	22
2. ANTIBIÓTICOS .....	22
2.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	23
2.1.1. Classes dos Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	23
Penicilinas .....	23
Cefalosporinas.....	24
Carbapenemos.....	25
Monobactams .....	25
2.1.2. Mecanismos de resistência .....	26
Alteração do local de ligação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) .....	26
Impermeabilidade.....	26
Bombas de efluxo .....	27
$\beta$ -lactamases.....	27
2.2. Outras classes de Antibióticos.....	29
Aminoglicosídeos .....	29
Macrólidos.....	30
Tetraciclina.....	30
Quinolonas .....	30
Fenicolis .....	31
3. $\beta$ -LACTAMASES DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS .....	31
3.1. $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) .....	31
3.2. Carbapenemases.....	33
3.3. $\beta$ -lactamases do tipo AmpC.....	36
4. MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	37
4.1. Plasmídeos.....	37
4.2. Transposições.....	38
4.3. Integrões.....	38
4.4. Sequências de Inserção .....	38
5. RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA COM A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS .....	38

6. INFLUÊNCIA DAS ÁGUAS RESIDUAIS NAS ÁGUAS DE CONSUMO HUMANO - CONTAMINAÇÃO DOS LENÇÓIS FREÁTICOS .....	40
<b>I. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
1. AMOSTRAGEM .....	44
2. COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	45
3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	45
4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	46
5. TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS (TSA) .....	46
6. PESQUISA FENOTÍPICA DE ESBLs.....	47
6.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO .....	47
7. PESQUISA FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES.....	48
7.1. MÉTODO DE INATIVAÇÃO DE CARBAPENEMOS (CIM).....	48
7.2. TESTE COM EDTA.....	49
8. PESQUISA FENOTÍPICA DE AMPC .....	49
9. PESQUISA MOLECULAR DE $\beta$ -LACTAMASES .....	50
9.1. Fundamentos de PCR.....	50
9.2. Extração de DNA .....	50
9.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) .....	50
9.4. Identificação dos produtos de PCR por eletroforese.....	53
10. CONJUGAÇÃO.....	54
<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
1. ISOLADOS BACTERIANOS E TIPO DE COLHEITA.....	55
2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS .....	56
3. ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS MICROBIANOS AOS ANTIBIÓTICOS .....	69
4. DETECÇÃO DE ESBLs PELO TESTE FENOTÍPICO.....	85
4.1. Pesquisa de ESBLs por métodos moleculares.....	86
5. DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES PELO MÉTODO CIM E TESTE DE COMBINAÇÃO EM DISCO DE MEROPENEMO COM INIBIDORES DE CARBAPENEMASES .....	87
5.1. Pesquisa de Carbapenemases por métodos moleculares .....	87
6. DETECÇÃO DE AMPC PELO TESTE FENOTÍPICO.....	88
6.1. Pesquisa de AmpC por métodos moleculares .....	88
6.2. Conjugação .....	89
<b>IV. CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>V. PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>95</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

## Índice de Ilustrações

Ilustração 1 - Diferenças do grupo dos Coliformes .....	10
Ilustração 2 - Características dos meios de cultura .....	12
Ilustração 3 - Detecção de ESBLs através da presença de sinergismo causado pelo aumento do halo de inibição do (s) oximino - $\beta$ -lactâmico (s) sob influência do ácido clavulânico.....	32
Ilustração 4 - Contaminação de lençóis freáticos/Vias de transmissão de microrganismos pelo sistema de reutilização de águas residuais para rega agrícola .....	41
Ilustração 5 – Exemplo de locais de amostragem.....	44
Ilustração 6 – Resultado sugestivo de ausência de ESBL no isolado <i>E.coli</i> 30 .....	48
Ilustração 7 – Resultado sugestivo de presença de ESBL no isolado <i>Citrobacter freundii</i> 31.....	48
Ilustração 8 - Interpretação de resultados do teste CIM .....	49
Ilustração 9 - Descrição da técnica de conjugação .....	54
Ilustração 10 - Mapa da zona Norte com principais resultados por zonas geográficas.....	58
Ilustração 11 – Localização de poço em Lousada junto ao quintal.....	63
Ilustração 12 – Placa indicativa de água não controlada .....	66
Ilustração 13 – Fontanário com presença de elevada carga microbiana (>300UFC/100 ml) de coliformes e não coliformes .....	66
Ilustração 14 - Antibiógrama do isolado <i>Klebsiella pneumoniae</i> 12.....	74
Ilustração 15 - Antibiógrama alargado do isolado <i>Klebsiella pneumoniae</i> 12.....	75
Ilustração 16 - Antibiógrama do isolado <i>Citrobacter freundii</i> 3 .....	76
Ilustração 17 – Antibiógrama alargado do isolado <i>Citrobacter freundii</i> 3 .....	76
Ilustração 18 - Antibiógrama alargado do isolado <i>Enterobacter cloacae</i> 7.....	77
Ilustração 19 - Fotografia da localização de poço e fossa.....	78
Ilustração 20 – Antibiógrama do isolado <i>Shigella</i> 29.....	79
Ilustração 21 – Antibiógrama do isolado <i>Cedecea</i> 38 .....	79
Ilustração 22 – Antibiógrama do isolado <i>Pantoea</i> 38 .....	80
Ilustração 23 – Antibiógrama do isolado <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1 .....	81
Ilustração 24 – Antibiógrama alargado do isolado <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1.....	82
Ilustração 25 – Antibiógrama do isolado <i>Burkholderia cepacia</i> 19 .....	82
Ilustração 26 – Antibiógrama alargado do isolado <i>Burkholderia cepacia</i> 19 .....	83
Ilustração 27 - Antibiógrama do isolado <i>Myroides</i> 17 .....	83
Ilustração 28 - Antibiógrama do isolado <i>Pseudomonas fluorescences</i> 8 .....	84
Ilustração 29 - Antibiógrama alargado do isolado <i>Pseudomonas fluorescens</i> 8 .....	85
Ilustração 30 - Detecção do gene codificador de AmpC .....	88
Ilustração 31 - Colónias não fermentadoras da lactose e resistentes à streptomina e Cefoxitina ...	90
Ilustração 32 - Antibiógramas dos Transconjugantes .....	91
Ilustração 33 - Antibiógrama do isolado <i>Klebsiella pneumoniae</i> 12 (dadora) .....	91
Ilustração 34 - Antibiógrama <i>E.coli</i> HB101 (receptora) .....	91

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das amostras colhidas pelos locais de amostragem.....	55
Gráfico 2 - Distribuição das amostras com presença/ausência de crescimento em meio de MacConkey pelos locais de amostragem.....	68
Gráfico 3 - Distribuição dos isolados pelo tipo de fermentação da lactose.....	69
Gráfico 4 - Distribuição após seleção dos isolados pré-selecionados com ampicilina.....	70
Gráfico 5 - Distribuição das bactérias isoladas por família.....	70

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos da água potável.....	11
Tabela 2 - Surtos ocorridos por veiculação hídrica na Europa.....	15
Tabela 3 - Resistência intrínseca de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
Tabela 4 - Classificação de Beta-lactamases.....	28
Tabela 5 - Distribuição das amostras pela zona geográfica.....	44
Tabela 6 - Condições do PCR Multiplex TEM, SHV e OXA.....	51
Tabela 7 - Condições do PCR Multiplex CTX-M (grupos 1, 2, 8, 9 e 25).....	51
Tabela 8 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene das ESBLs.....	51
Tabela 9 - Condições do PCR Multiplex para Carbapenemases (NDM, VIM, IMP, KPC, OXA-48 SPM, AIM, GIM, BIC, SIM e DIM).....	52
Tabela 10 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene das carbapenemases.....	52
Tabela 11 - Condições do PCR Multiplex para AmpC <sup>103</sup> .....	53
Tabela 12 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene.....	53
Tabela 13 - Avaliação da qualidade microbiológica das águas para consumo humano não tratadas.....	56
Tabela 14 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas de origem pública.....	59
Tabela 15 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas de origem privada.....	61
Tabela 16 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas na região de Beire.....	65
Tabela 17 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas na região de Silves.....	67
Tabela 18 - Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> estudados.....	71
Tabela 19 - Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de Não- <i>Enterobacteriaceae</i> estudados.....	72
Tabela 20 - Teste fenotípico do disco combinado.....	85

## Índice de Quadros

Quadro 1 - Principais doenças de veiculação hídrica.....	14
Quadro 2 - Principais géneros da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	17
Quadro 3 - Constituição da microbiota intestinal.....	39
Quadro 4 - Resultados dos Teste com EDTA e CIM para pesquisa de Carbapenemases.....	87
Quadro 5 - Resultados da deteção da AmpC pelo teste fenotípico com Cloxacilina.....	88

## **I. Introdução**

O direito à água potável deve ser universal e deve-se garantir o acesso a água segura, suficiente e a um bom preço para uso doméstico e pessoal <sup>1</sup>.

O abastecimento público de água em relação à quantidade e qualidade é uma preocupação crescente da população, em função da escassez e deterioração da qualidade dos recursos de água<sup>1</sup>. Quando a água para consumo humano não é tratada e se encontra imprópria (contaminada ou poluída) pode conter microrganismos patogênicos ou substâncias químicas capazes de causar doenças ao homem, sendo estas denominadas doenças de veiculação hídrica <sup>2, 3</sup>. Surto é definido pela existência de duas ou mais pessoas que apresentem a mesma doença, após consumirem água contaminada da mesma origem ou quando adoecem tendo em comum a mesma fonte de contaminação (ingestão, contato, inalação, entre outros), devendo ser realizada vigilância <sup>4</sup>.

A avaliação da qualidade microbiológica da água tem um papel destacado no processo, devido à presença de um número elevado e grande diversidade de microrganismos, podendo alguns deles ser patogênicos, em geral de origem fecal, que podem estar presentes na água <sup>5, 6</sup>.

A pesquisa de patogênicos é de extrema dificuldade e insustentável, por isso realiza-se a pesquisa de organismos indicadores, que fornecem indicações sobre a qualidade da água e possibilidade de esta conter microrganismos patogênicos<sup>7</sup>. A escolha destes indicadores foi objeto de uma pesquisa criteriosa, realizada pela comunidade científica internacional e continuamente alvo de tentativas de melhoria <sup>5</sup>.

Deve-se atuar de forma preventiva, antecipação de problemas de qualidade da água, ou recorrer à ação corretiva, determinada após a observação da violação dos padrões de potabilidade da água mediante as análises laboratoriais <sup>1</sup>.

Normalmente os principais microrganismos que se encontram presentes quando a água é imprópria para consumo são de origem fecal, sendo a maior parte microrganismos Gram-negativos relacionados com a constituição da microbiota intestinal<sup>8</sup>. Estes microrganismos têm vindo a aumentar a sua resistência aos antibióticos, tornando-se um problema cada vez maior para a população e reportando-se cada vez mais casos de multirresistência bacteriana <sup>9-11</sup>.

Os antibióticos são fármacos que se utilizam para tratar as infeções bacterianas. Infelizmente, são cada vez mais as bactérias que desenvolvem resistência. Esta resistência forma-se, em parte, devido ao uso desmedido e irresponsável de antibióticos e porque quando se ingere antibióticos, cerca de 80-90% do antibiótico ingerido não é degradado e é expelido ainda intacto para meio ambiente (como resíduo), contaminando a água e

mantendo a sua capacidade para atuar nas bactérias e selecionar bactérias resistentes, como produtos residuais <sup>11-15</sup>.

## 1. A água

A água enquanto composto químico é composta por dois átomos de hidrogénio e um de oxigénio (H<sub>2</sub>O), sendo a substância mais abundante no corpo humano, chegando a constituir cerca de 50 a 65% do peso de um adulto. A água é um dos bens mais preciosos que existe no planeta, sendo indispensável à vida de qualquer espécie <sup>16, 17</sup>.

O conceito de qualidade de água não é absoluto, uma vez que esta depende do fim para que é utilizada <sup>18</sup>.

A água é um recurso natural essencial, seja como componente bioquímico de seres vivos, como meio de vida de várias espécies vegetais e animais, como elemento representativo de valores sociais e culturais e até como fator de produção de vários bens <sup>7, 17, 19</sup>.

Cerca de 70% do planeta é constituído por água, sendo que somente 3% são de água doce e, desse total, 98% corresponde a água subterrânea. Isto significa que a maior parte da água disponível e própria para consumo é escassa. Nas sociedades modernas, a busca do conforto implica necessariamente um aumento considerável das necessidades diárias de água, sendo importante a sua reutilização <sup>20</sup>.

As águas para consumo humano são águas doces que têm diferentes origens de captação, podendo ser subterrânea ou superficial:

- **Água subterrânea:** toda a água que advém da superfície da Terra, preenchendo os poros ou vazios intergranulares das rochas sedimentares, ou mesmo as fraturas, falhas e fissuras das rochas compactas, e que devido às forças de adesão e da gravidade conseguem manter a humidade do solo e do fluxo dos rios e lagos.
- **Águas superficiais:** englobam a água da chuva, do mar, dos rios, lagos, albufeiras, barragens e represas <sup>16, 17, 19</sup>.

### 1.1. Águas para consumo humano

A água para consumo é um bem precioso e cada vez mais escasso devido ao uso irracional e à poluição de fontes importantes como os rios e lagos <sup>16, 21</sup>. Consiste em toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada à alimentação (cozinhar e preparação de alimentos), à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem com ou sem fins comerciais. É também toda a água utilizada na indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano <sup>16, 22</sup>.



A água está presente em múltiplas atividades humanas e, como tal, é utilizada para finalidades muito diversificadas, entre elas, o abastecimento doméstico e público, uso agrícola e industrial, a produção de energia elétrica e, naturalmente, o lazer. A rapidez com que as transformações se dão atualmente nas sociedades, por um lado traz benefícios como, por exemplo, tecnologias que melhoram o diagnóstico e o fazem precocemente possibilitando uma expectativa de vida maior e com melhor qualidade. Contudo, as tecnologias impróprias trazem prejuízos para a sociedade, como transferência inadequada de esgotos industriais e sanitários para o meio ambiente. Este modelo de urbanização trouxe problemas preocupantes como a poluição do ambiente, que tem causado mudanças no planeta tais como o aquecimento global, destruição da camada do ozono ou perda de biodiversidade, fatores que influenciam a qualidade da água e que a tornam menos disponível para consumo humano <sup>1, 21</sup>.

A qualidade da água que consumimos é hoje uma preocupação transversal, sobretudo a água da rede privada proveniente de poços, furos ou fontes, onde a contaminação acidental é um fator importante podendo levar a que a água fique imprópria para consumo. A qualidade da água é um conceito relativo, uma vez que nenhuma água é boa/adequada para todos os fins <sup>1, 16</sup>.

A água pode conter:

- Vários tipos de microrganismos saprófitas, cujo *habitat* natural é o solo, a água ou o ar
- Microrganismos patogênicos devido a contaminação com esgotos domésticos contendo matérias fecais, sendo os principais agentes causadores de muitas doenças veiculadas pela água <sup>2</sup>

## **1.2. Águas tratadas e não tratadas**

A água, devido às suas características físico-químicas não se encontra no seu estado puro. Os efeitos causados pelos contaminantes químicos presentes na água de consumo dependem principalmente das quantidades ingeridas, do tempo de exposição e da sensibilidade e fisiologia do indivíduo <sup>2</sup>.

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a contaminação corresponde à descarga de microrganismos, inclusive patogênicos, ou substâncias tóxicas na água, tornando a água imprópria para consumo. Já o termo poluição significa que a água está inadequada para determinada aplicação <sup>23</sup>.

Água tratada corresponde à água que após tratamento apresenta boa qualidade química e bacteriológica <sup>2, 24</sup>.

Água não tratada corresponde habitualmente a águas de minas, poços e nascentes que são contaminadas na sua maioria por produtos químicos, esgotos domésticos e lixo, que por infiltração de chuvas ou até mesmo pela rutura de redes de esgotos em centros urbanos, conduzem a contaminação de águas subterrâneas, contribuindo para a veiculação hídrica de vários agentes patogénicos <sup>7, 24</sup>.

### **Principais fontes de contaminação das águas de consumo não tratadas**

O fenómeno da contaminação consiste na introdução de substâncias que provocam alterações prejudiciais no meio aquático, caracterizando assim a ocorrência da poluição. Os agentes contaminantes de maior importância correspondem à presença de matéria orgânica, de microrganismos patogénicos, de compostos organossintéticos e de metais pesados <sup>4, 25</sup>.

A contaminação por matéria orgânica tem como principal origem os esgotos domésticos e as águas residuais de indústrias que processam matéria orgânica <sup>2, 4</sup>. Tendo como referência o tipo de substâncias poluentes, os riscos de contaminação podem resumidamente ser divididos nas seguintes categorias:

- Nutrientes provenientes de fontes pontuais e difusas
- Metais pesados e outras substâncias perigosas
- Micropoluentes orgânicos
- Compostos radioativos
- Sais <sup>2, 26</sup>;

### **1.3. A problemática de falta de água**

A água, para além do aspeto qualitativo, é indispensável que esteja disponível em quantidade suficiente para a satisfação das necessidades humanas. A escassez ou falta de água pode originar problemas graves de saúde, além de implicações a nível da salubridade ambiental, dos alimentos e da própria higiene individual. Em termos de consumo, as necessidades humanas em água dependem de vários fatores como os hábitos, o poder de aquisição/compra, o nível de educação, as características climáticas, o meio onde reside (urbano, rural) e o sistema de abastecimento <sup>1, 27</sup>.

Os principais erros que conduzem à escassez da água correspondem ao desperdício, contaminação e poluição <sup>27, 28</sup>.

Devido à poluição, os gases com efeito de estufa estão a causar alterações climáticas. O Sul da Europa está a ficar mais quente e mais seco enquanto o noroeste mais

temperado e húmido. Contudo, mesmo se as emissões parassem hoje, as alterações climáticas iriam continuar por muito tempo devido à bioacumulação dos gases com efeito de estufa na atmosfera. Os impactos são claramente visíveis no Ártico <sup>27</sup>.

À medida que as temperaturas sobem as reservas de água do Sul da Europa diminuem. Ao mesmo tempo, a agricultura e o turismo irão requerer mais água principalmente nas regiões mais quentes e secas <sup>28</sup>.

Um aumento na temperatura da água e uma diminuição do fluxo dos rios no sul irão também afetar a qualidade da água. O aumento das épocas de chuva e as cheias relâmpago irão aumentar o risco de poluição através das inundações devido às tempestades e às descargas de emergência das estações de tratamento de água <sup>28</sup>.

Para combater a escassez de água para consumo humano, em que um terço da população convive com a sede, têm sido criados diversos métodos, entre os quais a dessalinização. A dessalinização, apesar de ser um método muito caro, é cada vez mais disseminada no mundo. A dessalinização envolve a remoção do sal que se encontra na água para torná-la potável, mas isso não significa que o método se restrinja à água do mar. Hoje em dia, este método é aplicado até no reaproveitamento de água de esgoto <sup>27</sup>.

O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), da ONU, prevê que, em 15 anos, cerca de 2 biliões de pessoas viverão com escassez de água <sup>29</sup>.

Existem já alguns casos graves de escassez de água existentes em Espanha, Chipre, Grécia e Turquia, tornando ainda mais importante a procura de soluções para combater esta realidade <sup>29</sup>.

#### **1.4. Legislação em vigor**

No que concerne à legislação Portuguesa, o Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto presente no Diário da República Portuguesa, regula a qualidade da água destinada ao consumo humano e tem como objetivo proteger a saúde humana dos efeitos prejudiciais resultantes de qualquer contaminação da água destinada ao consumo humano, assegurando a sua salubridade <sup>22</sup>. Neste decreto-lei estão definidos valores paramétricos estabelecidos para os parâmetros microbiológicos e químicos. Os valores paramétricos estabelecidos na legislação são principalmente desenvolvidos para a prevenção da ocorrência de surtos sanitários, fornecendo uma informação limitada sobre a proteção do ambiente e da saúde<sup>22</sup>. São igualmente definidas a frequência e técnicas de amostragem e métodos a aplicar nas várias determinações <sup>22</sup>.

A Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR) é a autoridade competente para a coordenação e fiscalização da aplicação do presente decreto-lei e tem

como objetivo a vigilância sanitária que abrange os seguintes tipos de água destinada ao consumo humano:

- Água distribuída por sistemas de abastecimento público ou privado que sirvam uma população igual ou superior a 50 habitantes e/ou abasteçam caudais iguais ou superiores a 10 m<sup>3</sup>/dia;
- Fontes individuais de abastecimento público ou privado;
- Água utilizada na indústria alimentar ou em estabelecimentos que manuseiam géneros alimentícios;
- Água posta à venda em garrafas ou outros recipientes;
- Água distribuída por camiões ou navios cisterna;
- Água distribuída por sistemas de abastecimento particulares de entidades públicas ou privadas que exerçam atividades comerciais, industriais ou de serviços, excluindo-se do Programa os sistemas de abastecimento particulares unifamiliares e as fontes de estrada, exceto se incluídos num projeto/estudo específico <sup>22</sup>.

Este decreto considera 38 parâmetros que se encontram divididos em 3 grupos:

- **CR1 (Controlo de Rotina 1)**

Análise de parâmetros microbiológicos para detetar eventuais perigos para a saúde (Bactérias coliformes, *Escherichia coli* (*E. coli*)) e desinfetante residual <sup>22</sup>.

- **CR2 (Controlo de Rotina 2)**

Determinação de parâmetros organoléticos (odor, sabor, turvação e cor) e parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, condutividade, cloretos, cálcio, magnésio, alumínio, manganês, nitratos, nitritos e oxidabilidade) <sup>22</sup>.

- **CI (Controlo de Inspeção)**

Parâmetros relativos a substâncias tóxicas e indesejáveis (metais pesados, inseticidas, fungicidas, herbicidas e a presença de compostos aromáticos), contaminação fecal e uso de adubos (nitratos, nitritos e amoníaco) <sup>22</sup>.

## **Quadro legal do controlo da qualidade da água**

O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto visa proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição <sup>22</sup>.

O crescimento populacional e industrial no mundo contribuiu para o elevado aumento de consumo da água disponível nas reservas hídricas mundiais, sendo cada vez mais importante a determinação da qualidade da água. A qualidade da água corresponde a um conjunto de avaliações que se traduzem em critérios com a finalidade de garantir a sua potabilidade para consumo humano. É comum recorrer a técnicas laboratoriais de análise muito diversificadas para verificação da potabilidade de uma água, que incluem a avaliação de parâmetros físicos-químicos, de substâncias tóxicas e indesejáveis e microbiológicos <sup>23</sup>.

Todas as análises de água devem dar origem a um documento, o boletim analítico, que deverá ser transmitido pelo responsável do laboratório. Os resultados das análises são em regra influenciados pela origem da amostra <sup>23</sup>.

A norma NP EN ISO 17025 reflete as práticas profissionais e a experiência de acreditação de laboratórios na Europa (NP EN 45001) e no resto do Mundo (Guia ISO/CEI 25) e incide sobre o nível dos requisitos do sistemas de gestão da ISO 9001:2000, consistindo em conceitos aplicados a laboratórios para realizar ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem <sup>30, 31</sup>.

## **Normas de qualidade utilizadas no decreto**

A norma é um documento produzido por um órgão oficial acreditado para tal, que estabelece regras, diretrizes, ou características acerca de um material, produto, processo ou serviço <sup>22</sup>. O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto estabelece as seguintes normas relativamente ao controlo microbiológico:

- Bactérias coliformes e *E. coli* (ISO 9308 -1)
- Enterococos (ISO 7899 -2)
- *Pseudomona aeruginosa* (EN ISO 12780)
- Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 22°C (EN ISO 6222)
- Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 37°C (EN ISO 6222)

- *Clostridium perfringens* (incluindo esporos) <sup>22</sup>

## **Parâmetros Microbiológicos**

- **Microrganismos a 22 °C e Microrganismos a 37 °C**

Os microrganismos a 22°C e a 37°C indicam a contaminação geral de uma água. A placa que incuba a 37°C (microrganismos mesófilos) assinala que a contaminação é de origem humana ou de animais de sangue quente e a placa a 22°C (microrganismos ambientais) indica que a contaminação é de origem ambiental <sup>25, 32</sup>.

Este parâmetro ganha maior importância quando se trata de água para consumo humano tratada, porque permite avaliar o grau de pureza e integridade dessa água <sup>32</sup>.

Quanto maior as contagens totais de microrganismos a 22°C e a 37°C, maior a probabilidade dessa água conter contaminação fecal <sup>33</sup>.

Em resumo, uma água própria para consumo humano não deve apresentar um número de colônias superior a 100 após incubação a 22°C, apesar de este resultado ser apenas indicativo, uma vez que os microrganismos podem ser inofensivos fazendo parte da flora natural das águas e dos solos <sup>5</sup>. Todavia, quando o número é superior a cerca de 300 colônias, é conveniente ter cuidados na utilização da água no sentido de proceder à sua esterilização (por fervura ou filtração) antes da utilização para consumo humano <sup>25</sup>.

- **Indicadores de Contaminação fecal**

A análise de uma água para consumo humano, feita de modo a identificar todos os microrganismos nela presente, é praticamente impossível a nível de rotina e economicamente insustentável <sup>34</sup>.

Como se verificou que microrganismos, não patogénicos ou de patogenicidade limitada, coexistiam com microrganismos patogénicos, foram considerados indicadores da sua presença <sup>19</sup>.

Os principais critérios que definem um microrganismo indicador de contaminação fecal da água consistem:

- O microrganismo deve estar presente na água sempre que existam microrganismos patogénicos
- Habitual colonizador do intestino de animais e de seres humanos
- Deve existir em número superior aos microrganismos patogénicos presentes

- Pesquisa e identificação por técnicas laboratoriais de fácil execução, rápidas e aplicáveis a todo o tipo de águas (torneira, rios, subterrânea, barragens, estuários, oceanos, águas residuais, entre outros)
- O microrganismo indicador deve ser mais resistente aos agentes desinfetantes do que os microrganismos patogénicos
- Não deve ser nocivo para os seres humanos
- A quantidade do microrganismo indicador na água contaminada deve ter uma relação direta com o grau de contaminação <sup>25, 32</sup>

**Nota:** A ausência de microrganismos indicadores de contaminação fecal não pode levar à conclusão da não existência de microrganismos patogénicos. Permite apenas concluir que a amostra não se encontra contaminada por material fecal <sup>25, 32</sup>.

### **Coliformes totais e *E. Coli***

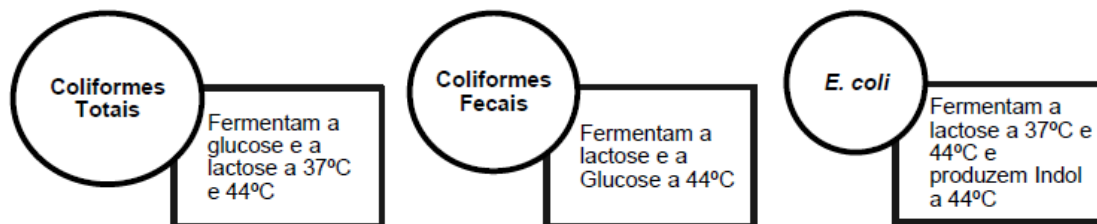
As bactérias do grupo Coliformes estão presentes no intestino humano e de animais de sangue quente, sendo eliminadas nas fezes em números elevados, consideradas assim, indicadoras de contaminação fecal <sup>32</sup>.

O grupo dos coliformes fecais compreende os géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Na avaliação da qualidade de águas naturais e fontes individuais de abastecimento, os coliformes totais têm um valor sanitário limitado. O indicador com maior precisão de contaminação fecal é a *E. Coli*, pois a sua presença indica contaminação de origem animal ou humana, podendo também estar presentes agentes patogénicos para o ser humano <sup>25</sup>.

### **Principais características:**

- Família *Enterobacteriaceae*
- Bacilo Gram-negativo não esporulado
- Aeróbios ou anaeróbios facultativos
- Oxidase negativa
- Catalase positiva
- Fermentadores da lactose <sup>5</sup>

O grupo dos Coliformes inclui bactérias não exclusivamente de origem fecal, podendo ocorrer naturalmente no solo, água e plantas, sendo importante a sua distinção como se pode verificar na ilustração 1 <sup>25</sup>.



**Ilustração 1 - Diferenças do grupo dos Coliformes**

\*Adaptado de 5

### **Enterococos fecais**

Microrganismos encontrados no trato gastrointestinal de animais e humanos. A sua presença revela práticas sanitárias inadequadas e de contaminação recente. Estes microrganismos apresentam maior resistência quando comparados com os coliformes totais <sup>32</sup>. A espécie *Enterococcus faecalis* encontra-se normalmente em grande número no trato intestinal dos animais de sangue quente. Neste grupo incluem-se também as espécies: *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* e *E. gallinarum* <sup>5, 15</sup>

#### **Principais características:**

- Cocos Gram-positivo
- Anaeróbios facultativos
- Catalase negativa
- Fermentadores da lactose
- Hidrolisam a esculina a 44°C em duas horas
- O seu crescimento ocorre aos 45°C mas também aos 10°C
- São resistentes a soluções salinas de NaCl a 6,5% e pH 9,6 <sup>5</sup>

### ***Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* é indicador de poluição hídrica de origem fecal remota ou intermitente, devido ao longo período de permanência dos esporos na água e ao facto de serem extremamente resistentes às condições desfavoráveis em ambientes aquáticos, incluindo radiação UV, temperatura e pH extremos e processos de desinfecção, como a cloragem <sup>32</sup>.



É comum no trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, encontrando-se largamente disseminados na natureza, principalmente no solo e em águas contaminadas com fezes <sup>34</sup>.

### Principais características:

- Bacilo Gram-positivo
- Anaeróbio estrito
- Produz esporos subterminais
- Imóvel, nitrato e sulfito redutor
- Provocam  $\beta$ -hemólise
- Fermentador da lactose e liquefaz a gelatina

A presença de *Clostridium perfringens* sob a forma de esporos dá indicação de uma contaminação antiga <sup>5</sup>.

Na tabela 1 encontram-se apresentados os valores paramétricos estipulados no Decreto – lei 306/2007 de 27 de Agosto <sup>22</sup>.

**Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos da água potável**

Microrganismos	Valor paramétrico*	Unidade
<b>Águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes</b>		
Microrganismos viáveis 37°C	<20	ufc/ml
Microrganismos viáveis 22°C	<100	ufc/ml
<i>Escherichia coli</i>	0	ufc/250ml
Enterococos fecais	0	ufc/250ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	ufc/250 ml
<b>Água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição</b>		
<i>Escherichia coli</i>	0	ufc/100ml
Enterococos fecais	0	ufc/100ml

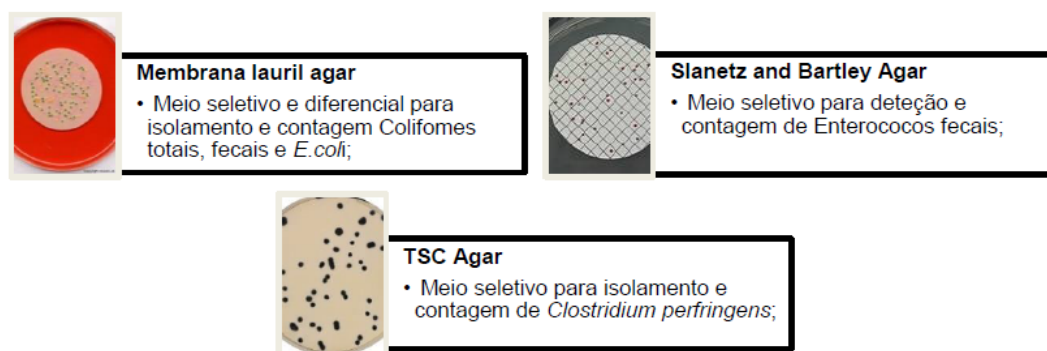
\*Valor paramétrico corresponde ao valor máximo ou mínimo fixado para cada um dos parâmetros a controlar, tendo em atenção o disposto no presente decreto – lei

\*\* Adaptado do Decreto-Lei n.º 306/2007 presente no Diário da República de <sup>22</sup>

### Métodos de análise Microbiológica

#### • Filtração por membrana

É uma técnica de sementeira que consiste na filtração de 100 mL de água sob vácuo na rampa de filtração através de uma membrana de éster de celulose ou acetato de celulose com um diâmetro de 0,47 mm e uma porosidade de 0,45  $\mu$ m. Após a filtração a membrana é colocada nos respetivos meios de cultura seletivos (ilustração 2) para que se possa quantificar o crescimento bacteriano <sup>5, 35</sup>.



**Ilustração 2 - Características dos meios de cultura**

\* Adaptado de <sup>32</sup>

O sistema de filtração é composto por postos de filtração, por uma bomba de vácuo e um recipiente que recolhe a água, para que não haja contaminação entre as amostras <sup>35</sup>. Por esta técnica são efetuadas contagens dos Coliformes totais, *E. Coli*, Enterococos fecais e *Clostridium perfringens* <sup>35</sup>.

Esta técnica é recomendada pelo *Standard of Methods for the Examination of Water and Wasterwater*, <sup>36</sup>, referência internacional em análises de águas, e pelo Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto <sup>22</sup>.

### **1.5. Destino de águas usadas**

#### **Saneamento Básico**

A eficiência, a qualidade e a universalidade dos serviços de saneamento básico são fundamentais para a qualidade de vida da população <sup>37</sup>.

A existência ou não de água potável e de saneamento básico pode promover ou, pelo contrário, impedir o desenvolvimento humano. O acesso à água para além de ser um direito humano fundamental é um importante indicador do desenvolvimento dos povos. Um dos grandes problemas associados à má qualidade da água de consumo é a falta de saneamento básico <sup>38</sup>.

O saneamento básico corresponde a um conjunto de medidas adotadas por uma determinada região com o intuito de garantir o acesso a água potável e a melhores condições higiénico-sanitárias <sup>37, 38</sup>.

O abastecimento de água potável é constituído pelas atividades, infraestruturas e instalações necessárias ao abastecimento público de água potável, desde a captação até as ligações prediais e respetivos instrumentos de medição <sup>37</sup>.

Há graves consequências sobre o meio ambiente associadas ao despejo direto da água utilizada, sem tratamento adequado, sobre o solo, atingindo lençóis freáticos, assim como em rios, lagos e no oceano <sup>37</sup>.

A falta de saneamento traz implicações económicas relevantes. Em particular, as regiões desprovidas de saneamento sofrem uma inibição em relação ao desenvolvimento económico. Entre os vários exemplos, é de realçar o caso do setor de turismo, cuja disseminação poderia trazer benefícios significativos a regiões carentes, mas que tem como obstáculo a falta de infraestrutura de saneamento <sup>1</sup>.

### **Fossas Sépticas**

As fossas sépticas são aplicáveis no tratamento biológico de efluentes domésticos (cozinha e casa de banho) sempre que se verifique a impossibilidade de ligação à rede de esgotos municipais, tornando-se obrigatório o uso de instalações necessárias para a depuração biológica e bacteriana das águas residuais <sup>39, 40</sup>.

Nas fossas sépticas, os esgotos (dejetos e águas utilizadas) sofrem ação das bactérias anaeróbias, sendo a matéria orgânica convertida em gases ou substâncias solúveis dissolvidas no líquido contido nas fossas. No fundo da fossa encontram-se depositadas partículas minerais sólidas, o lodo, formando-se na superfície do líquido uma camada de espuma constituída por substâncias insolúveis que evitam a circulação do ar, favorecendo a ação das bactérias anaeróbias <sup>39, 41</sup>.

A formação de nitritos tem especial importância na saúde pública por dois motivos: em primeiro lugar pode oxidar a hemoglobina em metahemoglobina, pigmento incapaz de atuar como portador de oxigênio. Em segundo lugar, sob determinadas condições os nitritos podem reagir com aminas secundárias e terciárias (comumente encontradas em alimentos e outras fontes) para formar as nitrosaminas, compostos químicos cancerígenos

<sup>39, 41</sup>.

As fossas sépticas são uma alternativa somente quando não há saneamento <sup>39, 40</sup>.

### **1.6. A Problemática das águas impróprias para consumo**

Um dos maiores problemas de saúde no mundo, encontrados principalmente em países em desenvolvimento, são as doenças transmitidas pela água. Estas encontram-se contaminadas por vários tipos de microrganismos saprófitas, cujo *habitat* natural pode ser o solo, a água ou o ar e por microrganismos patogénicos em resultado de contaminação com esgotos domésticos contendo matérias fecais <sup>2, 16</sup>.

Os agentes causadores de muitas doenças veiculadas pela água são na grande maioria de origem fecal <sup>16, 33</sup>.

## Doenças de veiculação hídrica

A implantação de sistemas públicos de água tratada e de esgotos reduziu drasticamente os casos de doenças infecciosas. Contudo, as águas provenientes da bica, fontes, poços (inclusive artesianos) e até mesmo água mineral (engarrafada sem os procedimentos adequados ou de fontes clandestinas) são responsáveis por surtos notificados veiculados pela água (quadro 1) <sup>3, 7, 33</sup>.

A água é normalmente habitada por vários tipos de microrganismos que dela extraem os elementos indispensáveis à sua subsistência. Contudo, quando são introduzidos organismos parasitários e/ou patogênicos, que utilizam a água como veículo e que podem causar doenças, constituem um risco para a saúde <sup>7</sup>.

**Quadro 1 - Principais doenças de veiculação hídrica**

Doença	Agente etiológico	Fontes de contaminação
<b>Bactérias</b>		
Febre tifoide	<i>Salmonella Typhi</i>	Transmissão fecal-oral
Febre paratifóide	<i>Salmonella Paratyphi</i>	Transmissão fecal-oral
Disenteria bacilar	<i>Shigella dysenteriae</i>	Transmissão fecal-oral
Gastroenterite	<i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Transmissão fecal-oral
Cólera	<i>Vibrio cholera</i>	Transmissão fecal-oral
<b>Vírus</b>		
Hepatite A e E	Vírus da hepatite A e E	Transmissão fecal-oral
Poliomielite	Vírus da poliomielite	Transmissão fecal-oral
Doenças respiratórias	Adenovírus	Transmissão fecal-oral
Meningite asséptica	Enterovírus	Transmissão fecal-oral
Gastroenterite	Rotavírus Vírus de Norwalk	Transmissão fecal-oral
<b>Protozoários</b>		
Criptosporidiose	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium muris</i>	Transmissão fecal-oral
Disenteria amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i>	Transmissão fecal-oral
Giardíase	<i>Giardia lamblia</i>	Transmissão fecal-oral
Schistosomose	<i>Schistosoma mansoni</i>	Transmissão fecal-oral
Oxiuríase	Enterobios vermiculares	Transmissão fecal-oral

\* Adaptado de <sup>7, 32</sup>

## Surto associados a águas de consumo não tratadas

O termo surto é definido pela existência de duas ou mais pessoas que apresentem a mesma doença, após consumirem água contaminada da mesma origem ou quando tem em comum a mesma fonte de contaminação (ingestão, contato, inalação ou outras fontes ou formas/veículos/vetores de transmissão) <sup>42</sup>.

A investigação epidemiológica torna-se de extrema importância para se identificar e diferenciar a causa da transmissão e a partir dessa constatação criar medidas mais eficazes no controlo e prevenção <sup>43</sup>.

A maioria dos agentes infecciosos pode ser adquirida através de transmissão fecal-oral, resultante da contaminação de água e alimentos por dejetos, direta ou indiretamente. O tratamento inadequado de dejetos, sobretudo de origem humana, proporciona a contaminação da água utilizada para consumo e preparação de alimentos. A contaminação pode ocorrer antes, durante ou após a preparação dos alimentos e pode estar relacionada com:

- Lavagem de alimentos com água contaminada;
- Preparação inadequada (alimentos não lavados adequadamente, crus ou mal cozinhados)
- Manipulação de alimentos ou utensílios sem uma correta higiene prévia (mãos que não foram adequadamente lavadas)
- Consumo de alimentos preparados por vendedores ambulantes
- Alimentação diretamente com as mãos
- Partilha de utensílios <sup>43</sup>

Na tabela 2 encontram-se resumidamente os principais surtos ocorridos na Europa, caracterizados epidemiologicamente pelo *Eurosurveillance*.

**Tabela 2 - Surtos ocorridos por veiculação hídrica na Europa**

Agente etiológico	Número de casos	Ano	País	Referência
<i>Norovírus e Rotavírus</i>	2860	Maio a Setembro de 2006	Itália	44
<i>Cryptosporidium</i>	7960	2005	Europa (16 países)	45
<i>Legionella pneumophila</i>	21	Julho a Agosto de 2012	Reino Unido	46
<i>Vibrio cholerae</i>	2467	1970	Portugal	47
<i>Campylobacter, E.Coli, Salmonella, Yersinia enterocolitica, Norovírus, Rotavírus, Blastocystis hominis, Giardia intestinalis</i>	140	Janeiro a Fevereiro de 2007	Dinamarca	48
Hepatite A	352	Janeiro a Maio de 2013	Itália	49
<i>Cryptosporidium hominis e Cryptosporidium parvum</i>	3230	Agosto de 2012	Reino Unido	50
	584		Alemanha	
	524		Holanda	
<i>Cryptosporidium</i>	29	Maio de 2001	Irlanda	51
<i>norovirus, rotavirus, enterovirus, astrovirus</i>	30	Junho de 2009	Itália	52
<i>Salmonella Kottbus</i>	41	Outubro de 2006	Espanha	53
<i>Legionella pneumophila</i>	334	Outubro de 2014	Portugal	54

### 1.7. Flora bacteriana autóctone da água

A diversidade da flora das águas está relacionada com os mecanismos de funcionamento de rios, lagos, represas e também com o ciclo hidrológico, a variedade de habitats e nichos ecológicos. As principais bactérias presentes na flora autóctone da água para consumo humano são dos géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Xanthomonas* <sup>55</sup>.

O termo bactérias heterotróficas inclui todas as bactérias que usam nutrientes orgânicos para o seu crescimento. Estas bactérias estão presentes em todos os tipos de água, alimento, solo, vegetação e ar. A contagem por bactérias heterotróficas representa diversos microrganismos isolados a partir de um método particular, utilizando meios de cultura, tempo e temperatura de incubação, e a forma de inoculação no meio adequados <sup>56</sup>.

O controlo da população bacteriana geral da água é de extrema importância, porque densidades muito elevadas de microrganismos podem determinar a deterioração da qualidade da água, com o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis, ou seja, este controlo permite avaliar as condições higiénicas da rede de distribuição e dos reservatórios da água. Além disto, apesar da maioria das bactérias da flora normal da água não ser considerada patogénica, algumas delas podem agir como bactérias patogénicas oportunistas <sup>55, 56</sup>.

### 1.8. Bactérias encontradas na água

#### 1.8.1. *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são caracterizadas por serem bacilos Gram-negativos, com muitas propriedades em comum. Trata-se de uma família numerosa constituída por bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, asporogénicos, imóveis e móveis, com flagelos peritricos (exceto *Tatumella ptyseos*), fermentadores da glucose, produtores de catalase e citocromo c -oxidase negativos. A utilização fermentativa da glucose e a ausência da citocromo-oxidase são fundamentais para a sua diferenciação das famílias *Vibrionaceae* e *Pseudomonadaceae* <sup>57</sup>.

Embora estejam amplamente disseminadas na natureza, a maioria das bactérias pertencentes a esta família habita os intestinos do homem e dos animais, pertencendo à microbiota intestinal normal ou como agentes de infeção. A diferenciação dos géneros e espécies é realizada através de inúmeras provas bioquímicas. Por vezes, a diferenciação em espécies de bactérias do mesmo género, acarreta um elevado número de provas para diferenciá-las. Todavia, este problema não cria dificuldades de ordem prática, uma vez que a diferenciação entre as espécies é dispensável, sob o ponto de vista médico, na maioria das vezes <sup>13, 58</sup>.

No que diz respeito à antibioterapia, a maioria destas bactérias são sensíveis às ampicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol e ao ácido nalidíxico. A sua principal forma de resistência é mediada por fatores R, com exceção da resistência ao ácido nalidíxico que é determinada por mutação. A resistência adquirida por estas bactérias é geralmente múltipla, isto é, torna a bactéria simultaneamente resistente a vários grupos de antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas)<sup>58, 59</sup>. Em suma, o tratamento das infeções por enterobactérias deve ser realizado após indicação dos resultados de suscetibilidade antibiótica e não por medicação empírica, dado o comportamento heterogéneo das estirpes face aos antibióticos<sup>59</sup>.

Atualmente, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados a partir de processos infecciosos, em cerca de 70 a 80% isolados em rotina laboratorial. A frequência dos diferentes géneros e espécies é fortemente influenciada pelo local onde a infeção foi adquirida<sup>58</sup>.

Os membros desta família, de um modo geral, são de crescimento fácil em meios de cultura líquidos e sólidos, não exigindo qualquer tipo de suplemento<sup>57</sup>.

No quadro 2 encontram-se os principais géneros da família *Enterobacteriaceae*:

**Quadro 2 - Principais géneros da família *Enterobacteriaceae***

<i>Escherichia;</i> <i>Shigella;</i> <i>Edwardsiella;</i> <i>Salmonella;</i> <i>Citrobacter;</i> <i>Klebsiella;</i> <i>Enterobacter;</i>	<i>Serratia;</i> <i>Proteus;</i> <i>Morganella;</i> <i>Providencia;</i> <i>Yersinia;</i> <i>Erwinia;</i> <i>Hafnia;</i>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Adaptado de<sup>57</sup>

Os géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* são considerados de maior importância médica. Só a *E.coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. têm sido documentadas como patogénicos entéricos<sup>60</sup>.

- ***Citrobacter***

Embora as espécies de *Citrobacter* sejam encontradas com relativa frequência nos intestinos do homem, raramente são isoladas a partir de processos infecciosos. As principais infeções causadas por estas bactérias são: pielonefrites, meningites, abscesso cerebral e endocardite. Estas infeções tendem a predominar em indivíduos imunodeprimidos e, por essa razão, ocorrem maioritariamente em hospitais<sup>60</sup>.

*Citrobacter freundii* é produtor de  $\beta$ -lactamases cromossômicas susceptíveis de indução na presença de  $\beta$ -lactâmicos, não sendo susceptíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamases e à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos <sup>60</sup>.

- ***Klebsiella***

*Klebsiella pneumoniae* é a espécie mais frequente nas infecções humanas e é encontrada normalmente nos intestinos. É um dos bacilos Gram-negativos que causam pneumonia lobar. A pneumonia geralmente localiza-se nos lobos superiores, acompanhando-se de necrose que pode levar a formação de cavidades. Ocasionalmente, a bactéria é também encontrada em associação com infecções do aparelho urinário, endocardites e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas. Tem como características produzir colônias mucóides em meio de MacConkey, ser produtora de urease e de ser imóvel. A resistência aos  $\beta$ -Lactâmicos é devido, predominantemente, à presença da  $\beta$ -lactamase SHV-1, evidenciando elevada resistência às penicilinas hidrolisáveis, como ampicilina e amoxicilina <sup>61, 62</sup>.

*Klebsiella rhinoschleromatis* é o agente do escleroma, um processo granulomatoso que atinge as mucosas do nariz, seios paranasais, faringe, laringe, ouvido médio e até os brônquios <sup>60, 61</sup>.

- ***Enterobacter***

*Enterobacter* raramente é um agente primário de infecção. Frequentemente são isoladas a partir de diferentes espécimes clínicos e de pacientes hospitalizados<sup>60</sup>.

*Enterobacter cloacae* é uma das espécies mais frequentes nas infecções humanas (trato urinário, trato respiratório inferior, septicemia e feridas cirúrgicas), principalmente em meio hospitalar <sup>60</sup>.

- ***Shigella***

É uma das bactérias patogénicas entéricas responsáveis pela denominada disenteria bacilar, originando diarreias abundantes com sangue e muco <sup>63</sup>.

O género *Shigella* é composto por quatro espécies, designadas *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* <sup>63</sup>.

A doença humana causada por *Shigella* é designada por shigelose ou disenteria bacilar, geralmente transmitida ao Homem através da ingestão de água e alimentos contaminados pelo próprio Homem. A transmissão é feita por via fecal-oral direta, já que o Homem é o principal reservatório da natureza. Alguns estudos sugerem que 100 UFC



são suficientes para causar a doença. Aparentemente, esta pequena dose infectante é dependente da maior resistência que a *Shigella* apresenta ao suco gástrico <sup>64</sup>.

As estirpes de *Shigella* podem ser invasivas e criar uma toxina após a invasão celular. A shigelose localiza-se no íleo terminal e cólon, caracterizando-se por invasão e destruição da camada epitelial da mucosa, com intensa reação inflamatória local e lesões ulcerativas. Em consequência disso, o paciente geralmente apresenta leucócitos, muco e sangue nas fezes <sup>64, 65</sup>.

A infecção é superficial e só ocasionalmente atinge a submucosa ou os nódulos linfáticos mesentéricos, o que justifica a raridade da infecção sistêmica. Embora a invasão seja o seu principal mecanismo enteropatogénico, em algumas estirpes de *S. flexneri* e *S. sonnei* ocorre a produção de uma toxina termolábil, ativadora da adenilciclase, e uma enterotoxina com atividade citotóxica, mas cujo mecanismo da estimulação da secreção de fluidos não está esclarecido <sup>64, 65</sup>.

De um modo geral, estes microrganismos são sensíveis aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e às quinolonas, mas bastante resistentes aos sulfonamídicos. A realização do antibiograma com a *Shigella* isolada é uma conduta recomendável, pois a infecção pode ser causada por isolados resistentes a um outro antibiótico ou portadores de resistência múltipla. Praticamente não ocorre a produção de  $\beta$ -lactamases <sup>63</sup>.

- ***Escherichia***

Infeções causadas por *E. coli* são por estirpes encontradas normalmente nos intestinos e que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido do corpo humano. Causam infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias e abscessos. É também um habitante indígena do trato intestinal dos mamíferos e por este motivo, a sua presença em água de consumo humano é indicativo de poluição fecal <sup>10, 66</sup>.

*E.coli* é a causa mais comum de infecção urinária, sendo responsável pela maioria das infecções adquiridas na comunidade. A suscetibilidade à infecção urinária é variável, podendo haver um fator genético ligado a ela. O sintoma mais comum é a sensação de ardor durante o ato de urinar <sup>66</sup>.

A  $\beta$ -lactamase presente mais comum na *E.coli* é plasmídica, TEM-1, proporcionando uma elevada resistência às penicilinas hidrolisáveis, como ampicilina e amoxicilina <sup>10, 66</sup>.

Na tabela 3 encontram-se apresentadas as resistências intrínsecas associadas às bactérias da família das *Enterobacteriaceae*.

**Tabela 3 - Resistência intrínseca de *Enterobacteriaceae***

<b>Microrganismos</b>	<b>AMP</b>	<b>AUG</b>	<b>FOX</b>	<b>Aminoglicosídeos</b>	<b>Tetraciclinas/ Tigeciclina</b>	<b>F</b>
<i>Citrobacter koseri</i>	R	----	----	----	----	----
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	----	----	----
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	----	----	----
<i>Escherichia hermannii</i>	R	----	R	----	----	----
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	----	----	----	----
<i>Klebsiella spp.</i>	R	----	----	----	----	----
<i>Morganella morganii</i>	R	R	----	----	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	----	----	----	----	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R	----	----	----	R	R
<i>Proteus penneri</i>	R	----	----	----	R	R
<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	----	----	R	R
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	----	R (exceto: amicacina, arbecacina, e estreptomicina)	R	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	----	R (exceto: estreptomicina, gentamicina, e arbecacina)	----	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	----	----	----
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	----	----	----	----	----	----

**Legenda:** R – Resistente; AMP – Ampicilina; AUG – Amoxicilina com Acido Clavulânico; F - Nitrofurantoina

\*Adaptado de <sup>67</sup>

### **1.8.2. *Pseudomonadaceae***

*Pseudomonas* é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil, possui bastonetes retos ou ligeiramente curvos, não formadoras de endosporos, móveis com flagelos polares, não fermentadora da lactose. Apresentam resultado positivo no teste da oxidase e catalase positiva. Pode ser encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, podendo causar infecções oportunistas

<sup>68</sup>.

*Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria saprófita, muito comum no solo e na água. Apresenta resistência intrínseca a aminopenicilinas com e sem inibidores de  $\beta$ -lactamases e cefalosporinas de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> geração <sup>68</sup>.

### 1.8.3. *Xanthomonadaceae*

*Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria ubíqua em ambientes aquosos, solo e plantas. Em pacientes imunodeprimidos, pode levar a infecções nosocomiais <sup>69-71</sup>.

*S. maltophilia* coloniza frequentemente o trato respiratório e o seu crescimento em culturas microbiológicas de amostras respiratórias, portanto, por vezes, de difícil interpretação e não uma prova de infecção. Se, no entanto, é cultivada a partir de locais que seriam normalmente estéreis (por exemplo o sangue), representam infecção verdadeira <sup>69, 70, 72</sup>.

A bactéria *S. maltophilia* ocupa um papel importante no cenário das infecções hospitalares. É considerada uma bactéria patogénica emergente, sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade, principalmente em pacientes sob terapia imunossupressora ou antibioticoterapia prolongada e de amplo espectro<sup>73</sup>. Outros fatores de risco significativos incluem: longo tempo de internamento, procedimentos invasivos, idade avançada e procedimento cirúrgico prévio <sup>66, 67</sup>.

O tratamento das infecções tem sido objeto de preocupação, uma vez que a bactéria exibe resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos disponíveis, caracterizando-se assim como microrganismo multirresistente, sendo caracterizada como intrinsecamente resistente a  $\beta$ -lactâmicos, evidenciando os carbapenemos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas e é sensível ao cotrimoxazol. Além disso, devido ao seu lento crescimento e à sua alta taxa de mutação pode rapidamente desenvolver resistência adquirida a outras classes de antimicrobianos. É então resistente intrinsecamente a aminopenicilinas com e sem inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefalosporinas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, cefoxitina, aztreonam, carbapenemos, aminoglicosídeos e ácido nalidíxico <sup>69-73</sup>.

### 1.8.4. *Burkholderiaceae*

*Burkholderia* é um género de bactérias Gram-negativas da família *Burkholderiaceae* e é caracterizado por serem bacilos retos, oxidase e catalase positivo, móveis, mesófilos e não esporulados com um flagelo polar único ou vários flagelos polares de acordo com as espécies. Ecologicamente são saprófitas que intervêm na reciclagem de matéria orgânica. O complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) constitui um grupo de microrganismos Gram-negativos não fermentadores da lactose amplamente encontrados no meio ambiente. A principal patologia associada às infecções causadas por espécies do CBc é um quadro séptico muito frequente em pacientes com fibrose cística, caracterizado por um declínio da função pulmonar, com posterior bacteremia e, em muitos casos, o óbito <sup>74, 75</sup>.

*Burkholderia cepacia* é uma bactéria patogénica oportunista em doentes com fibrose cística e apresenta uma grande capacidade degradativa de contaminantes orgânicos. É resistente intrinsecamente a aminopenicilinas com e sem inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, cefoxitina, aminoglicosídeos, cloranfenicol e ácido nalidíxico <sup>74</sup>.

Apresenta uma metalo- $\beta$ -lactamase (M $\beta$ L) capaz de hidrolisar com mais eficiência o imipenemo (PCM-1) do que o meropenemo, portanto, tem sensibilidade variável ao Meropenemo <sup>74, 75</sup>.

#### **1.8.5. *Flavobacterium***

Grupo bastante heterogéneo, constituído por diversas espécies. O seu crescimento em meio de cultura apresenta colónias lisas e por vezes pigmentadas (amarelas). É geralmente resistente aos  $\beta$ -Lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol e aminoglicosídeos <sup>76, 77</sup>.

*Myroides* é um dos géneros pertencente à família *Flavobacterium*, caracterizando-se por ser aeróbico Gram-negativo não fermentador da lactose, com pigmento amarelo e imóvel. Membros deste género estão amplamente disseminados no ambiente, especialmente em água, e comumente se comportam como bactérias patogénicas oportunistas, podendo causar infeção do trato urinário, endocardite, e infeções cutâneas em pacientes imunodeprimidos <sup>76</sup>.

É resistente a penicilinas com e sem inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração, cefoxitina, aztreonam, carbapenemos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas <sup>76, 77</sup>.

## **2. Antibióticos**

Antibióticos são substâncias químicas derivadas de organismos vivos ou produzidos por eles, capazes de inibir processos vitais de outros organismos <sup>14</sup>.

Os antibióticos, na sua maioria, são produzidos por microrganismos e outros resultam da modificação química de antibióticos conhecidos ou de metabolitos microbianos, como por exemplo: penicilinas e cefalosporinas semissintéticas, tetraciclinas e rifamicinas modificadas, clindamicina e troleandomicina. Há também antibióticos obtidos inteiramente por síntese, como é o caso de cloranfenicol. Todavia, alguns antibióticos apresentam alguns inconvenientes, como a bacitracina, estreptomicina, vancomicina que são potencialmente nefrotóxicos e o cloranfenicol, eritromicina, oleandomicina que são hepatotóxicos <sup>14, 72</sup>.

Os antibióticos são a classe mais prescrita e são utilizados no tratamento de diversas infecções e profilaxia de infecções. Devido ao seu uso indiscriminado, surgiram estirpes resistentes de diversos microrganismos patogênicos <sup>15, 78</sup>.

### **2.1. Antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos são substâncias antibacterianas produzidas por várias espécies de microrganismos (bactérias e fungos) que suprimem o crescimento de outros microrganismos. Contudo, dado o número crescente de moléculas de síntese (quimioterápicos), atualmente, o termo antibiótico engloba todos os compostos naturais ou de síntese com propriedade de antibiose <sup>79</sup>.

O uso de antibiótico destina-se:

- Atuar sobre as bactérias patogênicas suscetíveis à interrupção do seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático);
- Induzir a apoptose bacteriana (efeito bactericida, bacteriolítico);

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são constituídos estruturalmente pelo anel  $\beta$ -lactâmico (que dá o nome ao grupo) constituído por 3 átomos de carbono e um de azoto com radicais substituintes. Os  $\beta$ -lactâmicos dividem-se em quatro subgrupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems e têm como função inibir a síntese das paredes bacterianas <sup>10, 80</sup>.

#### **2.1.1. Classes dos Antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

##### **Penicilinas**

Descobertas em 1928, por Fleming, permanecem até hoje como uma excelente classe de antimicrobianos. São divididas em:

- Penicilinas naturais ou benzilpenicilinas
- Aminopenicilinas
- Penicilinas resistentes às penicilinasases
- Penicilinas de amplo espectro <sup>81</sup>

Em relação à farmacocinética, as penicilinas apresentam várias diferenças, as quais definem o seu uso clínico:

**A. Benzilpenicilinas ou penicilinas naturais** (Penicilina cristalina ou aquosa, Penicilina G procaína, Penicilina G benzatina e Penicilina V);

**B. Aminopenicilinas ou penicilinas semi-sintéticas** (Ampicilina e Amoxicilina);

- C. Penicilinas resistentes às penicilinases stafilocócicas** (Oxacilina e Meticilina);  
**D. Penicilinas de amplo espectro** (Ticarcilina e Piperacilina) <sup>81</sup>.

Esta classe de antibióticos é utilizada sobretudo no tratamento de pneumonias, otites e sinusites, faringites e epiglotites, infecções cutâneas, meningites bacterianas, infecções do aparelho reprodutor, endocardites bacterianas e profilaxia <sup>81</sup>.

## **Cefalosporinas**

Classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro divididos em quatro gerações <sup>81</sup>.

- **Cefalosporinas de primeira geração:**

São muito ativas contra cocos Gram-positivos e têm atividade moderada contra *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae* adquiridos na comunidade.

Não têm atividade contra *H. influenzae* e não agem contra *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, pneumococos resistentes à penicilina, *Enterococcus* spp. e anaeróbios.

Podem ser usadas durante a gestação e as mais comuns são: Cefalotina, Cefazolina, Cefalexina e Cefadroxila<sup>81</sup>.

- **Cefalosporinas de segunda geração:**

Comparando com as cefalosporinas de primeira geração, estas apresentam maior atividade contra *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e em determinadas circunstâncias aumento da atividade “*in vitro*” contra algumas bactérias da família das *Enterobacteriaceae*. As mais comumente utilizadas são: cefoxitina, cefuroxima e cefaclor. Sendo que a Cefoxitina é representante das cefamicinas <sup>77</sup>.

- **Cefalosporinas de terceira geração:**

São consideradas mais potentes contra bacilos Gram-negativos têm atividade antimicrobiana superior contra *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e outros *Streptococcus*. Com exceção da ceftazidima, apresentam atividade moderada contra os *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina, por outro lado, somente a ceftazidima tem atividade contra a *Pseudomonas aeruginosa*. Além da ceftazidima, a cefotaxima e ceftriaxona são outros antibióticos utilizados <sup>81</sup>.

- **Cefalosporinas de quarta geração:**

Apresentam ação sobre bactérias Gram-negativas, incluindo atividade antipseudomonas, além de apresentarem atividade contra cocos gram-positivos, especialmente *Staphylococcus* sensíveis à oxacilina. Também são resistentes às  $\beta$ -lactamases e pouco indutoras da sua produção. Desta subclasse tem-se como exemplo o cefepime <sup>81</sup>.

### **Carbapenemos**

Classe antibiótica composta pelo imipenemo, meropenemo, ertapenemo e doripenemo. Apresentam amplo espectro de ação para tratamento de infecções sistêmicas e são estáveis à maioria das  $\beta$ -lactamases <sup>82</sup>. Em relação à atividade antimicrobiana, o meropenemo é o antibiótico mais ativo contra bactérias Gram-negativas, ao passo que o imipenemo apresenta atividade um pouco superior contra Gram-positivos <sup>82</sup>.

O mecanismo de resistência envolve as porinas, descrito principalmente em estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, podem levar a que amostras sejam sensíveis a um carbapenemo e resistentes a outro <sup>81</sup>.

Por serem drogas de amplo espectro e com penetração na maioria dos locais de infecção, podem ser utilizados no tratamento de infecções em que exista uma forte suspeita de microbiota aeróbia e anaeróbia ou infecções causadas por organismos multirresistentes <sup>82</sup>.

### **Monobactams**

Classe antibiótica caracterizada pela presença de um anel monocíclico na sua estrutura. Têm ação bactericida e atuam como as penicilinas e cefalosporinas, interferindo na síntese da parede bacteriana. O antibiótico mais utilizado é o aztreonam <sup>81</sup>.

As bactérias da família das *Enterobacteriaceae* são normalmente sensíveis ao aztreonam, usado principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário, infecções pélvicas, infecções intra-abdominais e infecções respiratórias <sup>82</sup>.

É uma alternativa útil aos aminoglicosídeos por não ser neurotóxico e nefrotóxico, assim como às penicilinas e cefalosporinas, nos pacientes alérgicos <sup>82</sup>.

### **2.1.2. Mecanismos de resistência**

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibiótico, quando é capaz de crescer, *in vitro*, em função concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no local da infecção <sup>10, 80</sup>.

A resistência bacteriana adquirida a um ou mais antibióticos consiste na aquisição de uma característica nova por uma determinada espécie de bactéria. Estas modificações na população bacteriana permitem que resistam à ação dos antibióticos. A resistência pode ser denominada como:

- Simples (quando a bactéria resiste à ação de um único antibiótico);
- Múltipla (quando há simultaneidade de resistência a dois ou mais antibióticos);
- Cruzada (quando o mecanismo bioquímico da resistência para um determinado antibiótico se estende também sobre outros) <sup>79</sup>;

Os mecanismos de resistência adquirida são variados e incluem alteração nos recetores dos fármacos, redução da permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativo e inativação de fármacos <sup>79, 83</sup>.

#### **Alteração do local de ligação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs)**

A alteração de PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos nos cocos Gram-positivos e em algumas bactérias fastidiosas Gram-negativas, como a *Neisseria gonorrhoeae*, sendo um mecanismo raro em bacilos Gram-negativos <sup>80, 84</sup>.

A alteração do local do alvo onde atua determinado antibiótico, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo alvo resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original <sup>80</sup>.

#### **Impermeabilidade**

A dificuldade de penetrar a membrana externa dos Gram negativos é um dos poucos mecanismos de resistência bacteriana no qual uma alteração estrutural pode conferir resistência a diversas classes de antibióticos. A impermeabilidade da membrana externa ocorre quando bactérias mutantes originam canais proteicos da membrana externa bacteriana, as porinas <sup>84</sup>.



## Bombas de efluxo

O bombeamento ativo de antibióticos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antibióticos.

Proteínas de transporte transmembranares usadas pelas bactérias, para expulsar da célula substâncias tóxicas, incluindo múltiplos antibióticos, podem conferir assim múltiplas resistências <sup>84</sup>.

## $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas ou no periplasma de bactérias Gram-negativas. Os genes que codificam a produção dessas enzimas podem estar localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos. As  $\beta$ -lactamases de origem cromossômica são universais em algumas espécies bacterianas e as de origem plasmídica são variáveis, permitindo que os plasmídeos sejam transferidos entre espécies <sup>58, 80, 85</sup>.

As  $\beta$ -lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam antibióticos  $\beta$ -lactâmicos <sup>84, 85</sup>. Assim, essas enzimas foram classificadas segundo a estrutura primária (classe A à D) e características funcionais e bioquímicas (grupo I ao IV) <sup>58</sup>.

- Enzimas classificadas como classe A ou grupo II hidrolisam penicilinas e cefalosporinas;
- Enzimas classificadas como classe B ou grupo III hidrolisam carbapenemos;
- Enzimas classificadas como classe C ou grupo I hidrolisam cefalosporinas;
- Enzimas classificadas como classe D hidrolisam penicilinas e cloxacilina;
- Enzimas classificadas como grupo IV (penicilinases de *Pseudomonas cepacia*);

As  $\beta$ -lactamases podem ser detetadas na família das *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella* spp. e anaeróbios (espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, estirpes de *Prevotella*, *Porphyromonas* spp., *Bilophila wadsworthia*, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp.) <sup>58</sup>.

## Síntese e modo de transferência das $\beta$ -lactamases

Embora exista uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, um dos mecanismos mais importantes é a produção de  $\beta$ -lactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos relacionados, tornando-os inativos <sup>86</sup>.

A produção de  $\beta$ -lactamases constitui o principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems, por parte das bactérias Gram-negativas <sup>86</sup>.

As  $\beta$ -lactamases são enzimas ao catalisarem a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando a atividade antimicrobiana. A resistência ao antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico irá depender da:

- Quantidade de enzima produzida
- Habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão
- Velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana externa <sup>86</sup>

### Localização das $\beta$ -lactamases

As bactérias possuem um único cromossoma circular, disperso pelo citoplasma, composto por DNA de cadeia dupla que contém as informações necessária para a vida da célula. Os plasmídeos replicam-se independentes do cromossoma, albergam genes que não são essenciais para a vida das bactérias e podem ser transferidos, por conjugação, de uma bactéria para outra. Além deste mecanismo, as bactérias podem transferir material genético através da transformação, transdução e transposição <sup>86</sup>.

Nas bactérias Gram-negativas, as  $\beta$ -lactamases ficam retidas no espaço periplásmico, onde atacam os antibióticos antes de puderem alcançar o local dos recetores. Todavia, nas bactérias Gram-positivas, as  $\beta$ -lactamases são segregadas para o meio ambiente como as exoenzimas <sup>87</sup>.

### Classificação

Esta classificação divide as enzimas de acordo com a sua classe molecular, perfil do seu substrato e sensibilidade aos inibidores das  $\beta$ -lactamases (tabela 4) <sup>87</sup>.

**Tabela 4 - Classificação de Beta-lactamases**

Grupo funcional (classificação Bush-Jacoby-Medeiros)	Classe molecular	Enzimas representativas
1	C	<i>Escherichia coli</i> , AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, DHA-1
1e	C	GC1, CMY-37, SRT-1
2a	A	PC1 and other staphylococcal penicilinases

2b	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	ESBLs: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1, SFO-1
2br	A	IRTs: TEM-30, SHV-10, SHV-49
2ber	A	CMTs: TEM-50, TEM.68, TEM-121
2c	A	PSE-1, CARB-3
2ce	A	RTG-4
2d	D	OXA-1, OXA-10
2de	D	ESBLs: OXA-11, OXA-15, OXA-18
2 df	D	OXA-23, OXA-48
2e	A	CepA
2f	A	KPC-2, GES-2, SME-1, IMI-1, NMC-A, OXA-40
3a	B1	IMP-1, NDM-1, VIM-1, CcrA, Bc-II, IND-1
	B3	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B3	CphA, Sfh-1

\*Adaptado de <sup>87</sup>

## 2.2.Outras classes de Antibióticos

### Aminoglicosídeos

Este grupo de antibióticos é composto por exemplo por estreptomicina, gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomomicina <sup>81</sup>.

O mecanismo de ação consiste na associação do antibiótico à fração 30S dos ribossomas bacterianos inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas defeituosas. Para atuar, o aminoglicosídeo deve primeiramente ligar-se à superfície da célula bacteriana e posteriormente deve ser transportado através da membrana citoplasmática por um processo dependente de energia oxidativa <sup>81</sup>.

Existem três mecanismos reconhecidos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos:

- Alteração dos sítios de ligação no ribossoma;
- Alteração na permeabilidade;
- Modificação enzimática da droga.

As principais aplicações clínicas dos aminoglicosídeos são: tratamento de septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias, infecções intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares, osteomielites e infecções de articulações <sup>81</sup>.

Estes antibióticos possuem grande atividade contra bacilos e cocos Gram-negativos aeróbios, entre eles, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Acinetobacter* spp. e estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* <sup>81</sup>.

## Macrólidos

Grupo de antibióticos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares. Pertencem a este grupo, a azitromicina, a claritromicina, a eritromicina, a espiramicina, a miocamicina e a roxitromicina. O espectro de ação é semelhante, diferindo apenas na potência contra alguns microrganismos <sup>81</sup>.

## Tetraciclina

Antibióticos bacteriostáticos quando em concentrações terapêuticas. Apresentam amplo espectro de ação, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários <sup>81</sup>.

O mecanismo de ação consiste na entrada da tetraciclina na célula por difusão, num processo dependente de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica <sup>81</sup>.

O principal mecanismo de resistência microbiana é por diminuição da acumulação do antibiótico no interior da célula. A resistência pode ser cromossômica ou, mais frequentemente, mediada por plasmídeos ou transposões. Como exemplo desta classe tem-se a tetraciclina e a doxiciclina <sup>81</sup>.

## Quinolonas

As primeiras quinolonas a serem utilizadas na prática clínica foram: o ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina, como principal representante), com aumento do espectro, para os bacilos Gram-negativos e boa atividade contra alguns cocos Gram-positivos, todavia, pouca ou nenhuma ação sobre *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e anaeróbios, e por este motivo foram desenvolvidas novas quinolonas: a levofloxacina, a gatifloxacina, a moxifloxacina e a gemifloxacina. Contudo, recentemente a gatifloxacina foi retirada do mercado devido a alterações nos níveis de glicemia sobretudo em pacientes idosos e diabéticos <sup>81</sup>.

O mecanismo de ação consiste na inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias <sup>81</sup>.

A resistência ocorre, principalmente, por alteração na enzima DNA girase, que passa a não sofrer ação do antimicrobiano. Pode ocorrer por mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou por alteração da permeabilidade ao antibiótico pela membrana celular bacteriana (porinas) <sup>81</sup>.

Estes antibióticos estão indicados para o tratamento de infecções do trato genito-urinário, gastrointestinal e respiratório, em osteomielites, partes moles e contra micobactérias <sup>81</sup>.

**Nota:** As novas quinolonas têm espectro de ação contra a maioria dos bacilos Gram-negativos, contudo nenhuma é mais potente contra *Pseudomonas aeruginosa* do que a ciprofloxacina <sup>81</sup>.

## Fenicóis

Classe antibiótica que tem como representante o cloranfenicol <sup>77</sup>.

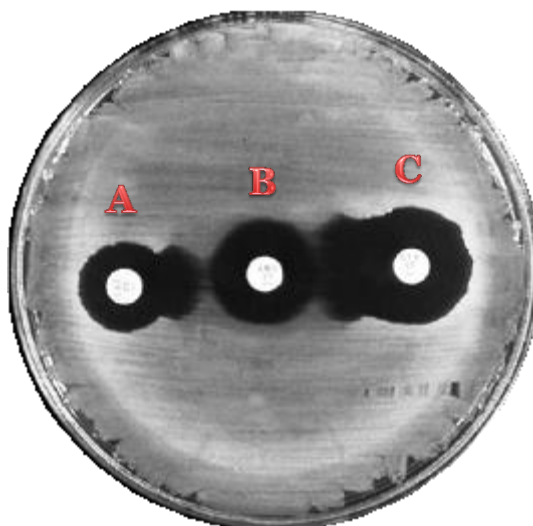
O cloranfenicol atua ligando à subunidade 50S do ribossoma, inibindo a síntese proteica da bactéria (ação bacteriostática) <sup>81</sup>.

## 3. $\beta$ -lactamases de bactérias Gram-negativas

### 3.1. $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs)

As ESBLs estão amplamente disseminadas entre os membros da família *Enterobacteriaceae* e estão descritas como enzimas do tipo TEM, SHV, OXA, grupo CTX-M (1, 2, 8, 9, 15 e 25). Além disso, as ESBLs são definidas como enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam e são inativadas por inibidores específicos, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam <sup>88</sup>.

As ESBLs provavelmente surgiram a partir de mutações na estrutura de  $\beta$ -lactamases com menor espectro hidrolítico. Estas mutações alteram a configuração e as propriedades do local ativo da enzima, tornando-as capazes de hidrolisar oximino- $\beta$ -lactâmicos. A detecção laboratorial pode ser realizada colocando um disco contendo Amoxicilina com ácido Clavulânico no centro em meio *Mueller-Hinton* e discos contendo antibióticos oximino- $\beta$ -lactâmicos colocados a cerca de 30 mm do centro. Um aumento do halo de inibição do(s) oximino- $\beta$ -lactâmico(s) causado pelo sinergismo do ácido clavulânico no disco da Amoxicilina com ácido clavulânico é indicado como um resultado positivo (ilustração 3) <sup>88, 89</sup>.



**Ilustração 3 - Detecção de ESBLs através da presença de sinergismo causado pelo aumento do halo de inibição do (s) oximino- $\beta$ -lactâmico (s) sob influência do ácido clavulânico** Legenda: A – Ceftazidima; B – Amoxicilina com Ácido Clavulânico; C – Cefotaxima;  
Adaptado de <sup>89</sup>

Os genes que codificam estas enzimas estão geralmente presentes em plasmídeos, os quais podem ser transmitidos entre bactérias da mesma espécie ou de géneros/espécies diferentes. As ESBLs são mais frequentes entre amostras clínicas da família das *Enterobacteriaceae*, especialmente a *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* <sup>90-92</sup>.

Outras classes de antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas podem ser alternativas terapêuticas. Entretanto, como isolados produtores de ESBLs também podem expressar outros mecanismos de resistência, sendo geralmente resistentes a estas outras classes de antimicrobianos, a sua utilização vai depender do resultado obtido pelo antibiograma <sup>93</sup>.

Um dos antimicrobianos que se pode utilizar como tratamento de infeções é a tigeciclina, visto que apresenta atividade contra a maioria dos bacilos Gram-negativos, à exceção de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e porque a sua atividade não é afetada pela produção de ESBLs e/ou  $\beta$ -lactamases cromossómicas <sup>94</sup>.

Embora os inibidores de  $\beta$ -lactamases apresentem atividade *in vitro* contra ESBLs, a utilização destes compostos como opção terapêutica para tratamento de infeções causadas por estes microrganismos não está bem estabelecida. Há indícios de que estes inibidores possam não ser ativos nos isolados clínicos hiper produtores de alguns tipos de ESBL e isolados produtores de ESBLs podem possuir outros mecanismos de resistência, como perda de porinas, contra os quais os inibidores de  $\beta$ -lactamases podem ser ineficazes

<sup>91, 92</sup>.

- **Famílias TEM e SHV**

Embora as ESBL da família TEM e SHV sejam mais frequentemente encontradas em *E.coli* e *K. pneumoniae*, elas também têm sido encontradas noutras bactérias da família das *Enterobacteriaceae*, tais como, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e em bactérias Gram- negativas não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* <sup>95, 96</sup>.

- **Família CTX-M**

As enzimas da família CTX-M hidrolisam as cefalosporinas de amplo espectro como característica intrínseca da enzima e têm origem em genes cromossômicos de espécies de *Kluyvera* spp.. Uma característica específica desta família é que estas enzimas hidrolisam mais a cefotaxima do que a ceftazidima.

A família CTX-M é formada por aproximadamente 70 enzimas que são separadas em grupos, de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos: grupo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-15 e CTX-M-25 <sup>95, 96</sup>.

- **Família OXA**

A maioria das  $\beta$ -lactamases OXA não hidrolisa cefalosporinas de amplo espectro, contudo enzimas derivadas da OXA-10 conferem resistência mesmo que fraca a estes antimicrobianos.

Estas  $\beta$ -lactamases pertencem à classe D segundo Ambler e grupo funcional 2d segundo Bush, sendo consideradas ESBLs atípicas <sup>95, 96</sup>.

- **Outras ESBLs**

Além das famílias de ESBL já faladas (TEM, SHV, OXA e CTX-M) há outras enzimas que também possuem atividade de espectro estendido, sendo descritas como: K1, BES-1, CME, GES-1, IBI-1, IBI-2, PER-1, PER-2, VEB-1, SFO-1, derivadas OXA), encontradas com menor frequência <sup>95, 96</sup>.

### **3.2.Carbapenemases**

Enzimas que condicionam resistência aos carbapenemos em microrganismos Gram-negativos <sup>105</sup>.

- **Carbapenemases de classe A**

Segundo a classificação de Bush, são consideradas serino-carbapenemases (grupo funcional 2f), apresentando um resíduo de serina na posição 70 do seu local ativo. Estão presentes em *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella* spp.<sup>97</sup>

As enzimas NMC/IMI, SME e KPC, pertencem a três grandes famílias de serino-carbapenemases de classe A que se caracterizam por hidrolisar uma variedade de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenemos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. A quarta enzima pertencente a este grupo, GES, apresenta uma ligeira hidrólise do Imipenemo e são sobretudo encontradas em *Pseudomonas aeruginosa* <sup>97</sup>.

A enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é a serino carbapenemase de maior importância. A enzima KPC apresenta grande capacidade de disseminação, associada à sua localização plasmídica ou à presença de elementos móveis de resistência <sup>97</sup>.

- **Metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls)**

As M $\beta$ Ls são  $\beta$ -lactamases pertencentes à classe 3, segundo classificação de Bush, caracterizam-se por hidrolisar todos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactams (aztreonam) e são resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, mas sensíveis à inibição por quelantes <sup>85</sup>.

O mecanismo de hidrólise destas enzimas é dependente de íons de Zinco divalentes no local ativo da enzima, resultando na inibição por EDTA ou compostos derivados do ácido tiológico, que tem como função quelar o catião Zinco divalente<sup>85</sup>.

Estas enzimas são produzidas intrinsecamente por diversas bactérias, nomeadamente: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Legionella gormanii* e *Aeromonas* spp.<sup>85</sup>.

As famílias mais comuns são: VIM, IMP, SPM, GIM e SIM e encontram-se relacionadas com um integrão de classe 1, com exceção da SPM-1 <sup>85</sup>.

As enzimas MBLs VIM e IMP encontram-se disseminadas geograficamente por todo o mundo, especialmente presentes nas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias da família das *Enterobacteriaceae* <sup>85</sup>.

Atualmente, são conhecidas quatro subclasses de M $\beta$ Ls adquiridas: IMP, VIM, SPM, e GIM <sup>85, 98</sup>.

As M $\beta$ L adquiridas são codificadas por genes localizados tanto no cromossoma como em plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, as demais



MβL adquiridas são codificadas por genes localizados em integrões que podem estar no cromossoma, transposões ou plasmídeos <sup>98</sup>.

- **Oxacilinas de classe D (OXA)**

As beta-lactamases OXA pertencem à classe D segundo Ambler e 2d segundo Bush. Conferem resistência às cefalosporinas, monobactams, penicilinas e carbapenemos, porém o seu substrato preferencial é a oxacilina e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. A grande maioria das OXA que hidrolisam os carbapenemos foi encontrada especialmente em *Acinetobacter baumannii*.<sup>97</sup>

Contudo, uma OXA-carbapenemase denominada de OXA-48 foi identificada em *Klebsiella pneumoniae* com elevada atividade contra os carbapenemos. Esta enzima é codificada por genes inseridos em plasmídeos <sup>97, 99</sup>.

Além das carbapenemases existem outros mecanismos que condicionam a resistência aos carbapenemos, nomeadamente:

- Diminuição da permeabilidade da membrana externa aos antimicrobianos, pela perda ou expressão reduzida de porinas
- Hiperexpressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração de antimicrobiano no espaço periplasmático

A diminuição da permeabilidade da membrana externa aos carbapenemos e outros antimicrobianos pode ocorrer por perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (porinas) e associada a β-lactamases com baixa afinidade para os carbapenemos, pode levar à redução da suscetibilidade aos carbapenemos <sup>85, 100</sup>.

Em bactérias Gram-negativas, o sistema de efluxo é composto por três componentes:

- Uma bomba de efluxo, situada na membrana interna ou citoplasmática
- Uma proteína formadora do canal de extrusão na membrana externa (OMP)
- Uma proteína de fusão (MFP) que liga estes dois componentes

Este sistema tem um amplo espectro, expulsando da célula bacteriana substratos como antimicrobianos, antissépticos, desinfetantes, desempenhando um papel importante na resistência intrínseca e adquirida em várias bactérias Gram-negativas patogénicas.

Uma mutação ou mesmo uma deleção nos genes reguladores pode resultar em hiperexpressão dos sistemas de efluxo, impedindo-os, assim, de atingirem seu local de ação <sup>97</sup>.

### 3.3. $\beta$ -lactamases do tipo AmpC

As amostras bacterianas pertencentes aos géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia* e isolados de *Proteus vulgaris* são produtores de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC (Grupo 1 segundo classificação de Bush, Jacoby e Medeiros). A hiperprodução desta enzima pode causar hidrólise de cefalosporinas, como ceftazidima e ceftriaxona, originando falência terapêutica durante o tratamento com estes antimicrobianos. As cefalosporinas de quarta geração e os carbapenemos são estáveis à hidrólise por AmpC <sup>93</sup>.

<sup>101</sup>.

Características das beta-lactamases do tipo AmpC:

- Antimicrobianos hidrolisados: aztreonam, cefalosporinas de amplo espectro e penicilinas de amplo espectro
- Cromossómicas em *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*
- Não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases
- Produzidas em pequena quantidade a menos que sejam induzidas ou que a sua expressão esteja desreprimida <sup>102</sup>

As  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC plasmídicas podem causar falhas no tratamento, semelhantes às descritas em infeções causadas por isolados hiperprodutores de AmpC cromossómica indutível ou no caso de seleção de mutantes com desrepressão estável em tratamentos com  $\beta$ -lactâmicos <sup>102 103</sup>.

As  $\beta$ -lactamases AmpC são enzimas codificadas por genes de origem cromossómicas denominados AmpC (*bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>LAT</sub>*, *bla<sub>ACT</sub>*, *bla<sub>MIR</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>*, *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>BIL</sub>*) e produzidas por bactérias pertencentes ao informalmente chamado grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp.) e também *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *E.coli*, *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. e *P. aeruginosa* <sup>103</sup>. Estas enzimas são produzidas por genes de localização cromossómica ou plasmídica <sup>103, 104</sup>. As beta-lactamases do tipo AmpC possuem uma modificação estrutural nas 10 regiões adjacentes ao seu local ativo, o que provavelmente levou à ampliação do seu espectro de ação <sup>104</sup>.

Os genes AmpC plasmídicos (pAmpC) são derivados dos genes cromossómicos de várias espécies da família *Enterobacteriaceae*. Estão normalmente localizados em integroes de classe I <sup>102</sup>, em plasmídeos onde também estão genes que determinam a resistência a outros antibióticos como as quinolonas, aminoglicosídeos e cloranfenicol, além de genes para a produção ESBL tipo TEM, SHV e CTX-M <sup>105</sup>. Devido a este ambiente genético, estes

genes disseminam-se facilmente através de transmissão horizontal e estirpes produtoras de pAmpC são normalmente multirresistentes e encontram-se disseminadas não somente em meio hospitalar mas também na comunidade <sup>101, 106, 107</sup>.

Em suma, esta classe de  $\beta$ -lactamases é produzida exclusivamente por bactérias Gram-negativas, pertencem ao grupo 1, segundo a classificação de Bush <sup>102, 106</sup>.

#### **4. Mecanismos de disseminação de Beta-lactamases em *Enterobacteriaceae***

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem apresentar resistência intrínseca e/ou resistência adquirida aos antibióticos alterando o seu perfil nativo de suscetibilidade aos antibióticos <sup>108</sup>.

- A resistência intrínseca aos antibióticos corresponde às características fenotípicas intrínsecas de espécie bacteriana, presente em genes cromossômicos, resultando em ausência de atividade dos antibióticos, transmitida verticalmente de geração em geração;
- A resistência adquirida aos antibióticos é resultado da alteração do genótipo como consequência da aquisição de novos genes de resistência aos antibióticos através de transmissão horizontal, a partir de bactérias que coabitam o mesmo ambiente, mediado por elementos genéticos móveis e/ou mutações nos genes alvo da ação do antibiótico <sup>108</sup>

A mobilização de genes de resistência aos antibióticos apresenta um papel fundamental na adaptação bacteriana, disseminação e persistência de genes de resistência aos antibióticos em diferentes espécies bacterianas, representando um problema mundial no tratamento de infecções e aplicação de medidas de controle de infecção <sup>108</sup>.

Os principais mecanismos de disseminação de ESBLs e de carbapenemases em *Enterobacteriaceae* são: plasmídeos, transposições, integrões e sequências de inserção <sup>108, 109</sup>.

##### **4.1. Plasmídeos**

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis transferíveis constituídos por DNA extracromossômico, de cadeia dupla circular ou linear, com capacidade de replicação autônoma localizados no cromossoma bacteriano e tendo como função evolutiva principal, a transmissão horizontal de genes de resistência aos antibióticos em bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes e o processo de conjugação <sup>108, 110</sup>.

Na região variável do plasmídeo localizam-se genes responsáveis pelas funções adaptativas, factores de virulência e produção de bacteriocinas, característica que facilita a disseminação bem-sucedida dos plasmídeos entre diferentes espécies bacterianas. Estes elementos genéticos móveis podem conferir resistência às principais classes de antibióticos nomeadamente aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas e trimetoprim, que podem estar contidos no mesmo plasmídeo<sup>108</sup>.

#### **4.2. Transposões**

Elementos genéticos móveis constituídos por DNA com duas sequências de inserção com capacidade de replicação e inserção no genoma e que através do mecanismo de transposição, realiza a transferência de segmentos, no cromossoma ou em plasmídeos<sup>108, 110</sup>.

#### **4.3. Integrões**

Os integrões são estruturas genéticas não transmissíveis com capacidade de capturar e integrar vários genes de resistência aos antibióticos, podem estar associados a transposões e/ou plasmídeos e ao cromossoma em grandes arranjos de cassetes de genes. Os integrões são constituídos por três elementos: o gene de integrase *intI* (codifica a enzima integrase); *attI* (local de recombinação do integrão com as cassetes genéticas) e o promotor que assegura a expressão do operão<sup>108, 110</sup>.

#### **4.4. Sequências de Inserção**

As sequências de inserção são considerados elementos genéticos simples transponíveis fazendo parte do cromossoma ou de plasmídeos, constituídas por sequências curtas de DNA sem capacidade de replicação autónoma<sup>108, 110</sup>.

### **5. Relação da microbiota intestinal humana com a resistência aos antibióticos**

A análise microbiológica das fezes humanas foi importante para estruturar e validar o uso de bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas ambientais. As bactérias presentes nas fezes são comensais do trato gastrointestinal humano. À medida que os hábitos alimentares evoluem, a microbiota intestinal sofre alterações. A dieta exerce uma acentuada influência sobre a composição relativa da microbiota intestinal (quadro 3), podendo reduzir os microrganismos benéficos e potenciar o desenvolvimento de bactérias prejudiciais<sup>111, 112</sup>.

**Quadro 3 - Constituição da microbiota intestinal**

<b>Microrganismos</b>	<b>Caracterização</b>	<b>Tipo de metabolism</b>
<i>Klebsiella</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia facultative
<i>Citrobacter</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia facultative
<i>Enterobacter</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia facultative
<i>Escherichia</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia facultative
<i>Serratia</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia facultative
<i>Bacteroides fragilis</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia estrita
<i>Fusobacterium</i>	Bactéria Gram-negativa	Anaeróbia estrita
<i>Proteus</i>	Bactéria Gram-negativa	Aeróbia facultativa
<i>Pseudomonas</i>	Bactéria Gram-negativa	Aeróbia facultativa
<i>Enterococcus</i>	Bactéria Gram-positiva	Anaeróbia facultativa
<i>Lactobacillus</i>	Bactéria Gram-positiva	Anaeróbia facultativa
<i>Bifidobacterium</i>	Bactéria Gram-positiva	Anaeróbia estrita
<i>Clostridium perfringens</i>	Bactéria Gram-positiva	Anaeróbia estrita
<i>Peptostreptococcus</i>	Bactéria Gram-positiva	Anaeróbia estrita

\*Adaptado de <sup>6, 70, 71</sup>

A flora intestinal é constituída por um número elevado de microrganismos, cujo peso total será cerca de 60% da massa seca de fezes e será representativa da alimentação que cada um realiza <sup>111-113</sup>.

Principais funções da flora microbiana:

- Ajuda na digestão de alimentos;
- Produção de vitaminas no lúmen intestinal;
- Estimulação e modulação da resposta imune;
- Manutenção da integridade da mucosa intestinal e da correta absorção seletiva de nutrientes <sup>111, 112</sup>;

Apesar da influência da alimentação na constituição da flora microbiana, a toma recorrente de antibióticos é considerada como sendo o fator com maior impacto <sup>79, 111</sup>.

Os antibióticos são fármacos destinados a eliminar as bactérias, independentemente de serem ou não benéficas, levando ao desequilíbrio da flora intestinal. A generalização do seu uso levou a que as bactérias causadoras de infeções graves se tornassem mais complexas e resistentes, o que implica que seja necessário recorrer a outros antibióticos eficazes <sup>79, 83</sup>.

Atualmente, o problema da resistência aos antibióticos continua a ser um importante fator a comprometer a sua utilização eficaz e consequente controlo das doenças infecciosas <sup>14</sup>.

A resistência das bactérias aos antibióticos de primeira escolha tem aumentado consideravelmente. Os principais agentes microbianos resistentes a antibióticos são:

- ***Klebsiella* spp e *E. coli*:** produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro alargado ou que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração <sup>10, 85</sup>;
- ***Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)** <sup>79</sup>;

- ***Enterococcus*** spp **resistentes à vancomicina (VRE)** <sup>79</sup>;
- ***Acinetobacter*** spp sensível somente a carbapenemos <sup>85</sup>;
- ***Pseudomonas*** spp resistentes a aminoglicosídeos, carbapenemos e/ou cefalosporinas <sup>85, 113</sup>;
- ***Enterobacter*** spp resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos de espectro alargado <sup>85</sup>;

## 6. Influência das águas residuais nas águas de consumo humano - contaminação dos lençóis freáticos

As águas residuais urbanas são águas residuais domésticas ou uma mistura de águas residuais industriais e pluviais recolhidas para a rede de drenagem pública <sup>35, 114</sup>.

A reutilização da água consiste na utilização de águas residuais tratadas para qualquer finalidade que consista num benefício socioeconómico <sup>33</sup>.

O conceito de reutilização da água é sinónimo de utilização de águas residuais tratadas pela Estação de tratamento de águas residuais (ETAR) <sup>35</sup>.

Na ETAR é realizado o tratamento secundário, mas este não remove completamente os constituintes das águas residuais, que assim são lançados no meio, contaminando as águas superficiais, mas também para o solo, o que permite que também possam contaminar as águas subterrâneas. Deste modo, a captação de água superficial e até subterrânea para abastecimento público, industrial ou agrícola, permite a utilização indireta e não planeada de efluentes da ETAR <sup>14, 33, 35</sup>.

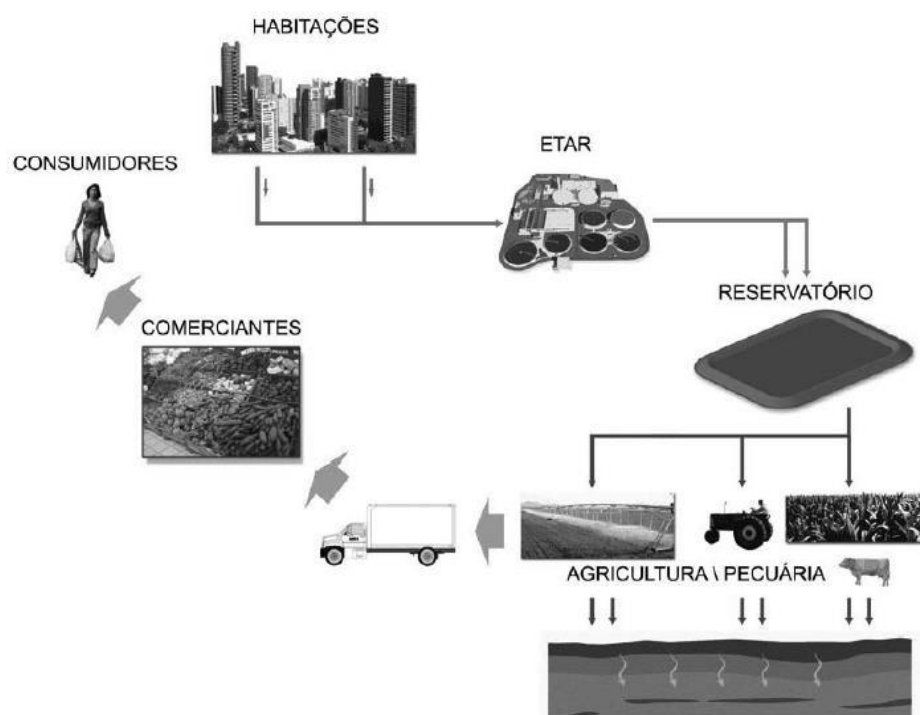
Os efluentes da ETAR possuem uma enorme variedade de compostos orgânicos sintéticos, constituindo assim uma fonte de preocupação ambiental, pois muitos destes compostos não são biodegradáveis, tais como compostos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inibidores de fertilidade <sup>33, 114</sup>.

Os grupos de poluentes químicos mais relevantes no contexto da reutilização da água são os seguintes:

- Sais;
- Metais pesados;
- Substâncias tensioativas;
- Sólidos em suspensão;
- Halogenetos orgânicos (AOX);
- Pesticidas;
- Produtos farmacêuticos (antibióticos);
- Poluentes orgânicos persistentes (POP) <sup>33, 114</sup>;

As águas residuais tratadas são frequentemente utilizadas na rega com a finalidade de satisfazer os requisitos agronómicos. Contudo, de um modo geral, os efluentes das ETAR contêm ainda microrganismos. Assim, a rega com efluentes de ETAR pode, constituir uma fonte de poluição das águas subterrâneas, configurando um risco de saúde pública<sup>14</sup> (ilustração 4).

A poluição de lençóis freáticos, rios e lagos, também ocorre por precipitação de poluentes atmosféricos e por escoamento superficial de dejetos de animais, fertilizantes, pesticidas e também por infiltração de águas originadas de fossas sépticas e de aterros sanitários <sup>26, 115 14</sup>.



**Ilustração 4 - Contaminação de lençóis freáticos/Vias de transmissão de microrganismos pelo sistema de reutilização de águas residuais para rega agrícola**

\*Adaptado de <sup>116</sup>

Um dos problemas da presença de bactérias multirresistentes aos antibióticos, bactérias que simultaneamente resistem a antimicrobianos de vários grupos químicos, consiste na sua persistência após o habitual tratamento secundário nas estações de tratamento, pelo que a sua presença em águas residuais tratadas pode levar à dispersão <sup>12-14, 117, 118</sup>.

Além disto, a toma de antibióticos é realizada em regime de ambulatorio e como o antibiótico não é totalmente absorvido pelo intestino, ou seja, parte é eliminada através das fezes, a contaminação de lençóis freáticos por fossas sépticas, pode conduzir à

disseminação de bactérias multirresistentes, constituindo um grave problema de saúde pública mundial <sup>9, 13, 14, 119</sup> .

A agroindústria também contribui para a poluição/contaminação das águas com resíduos orgânicos gerados e não tratados e produtos químicos utilizados (adubos) cujos resíduos se infiltram no solo ou são conduzidos pela chuva para águas de poços <sup>26</sup>. Estes resíduos poluentes produzem nutrientes que favorecem o crescimento de bactérias decompositoras que consomem oxigénio, diminuindo a concentração deste na água <sup>9, 120</sup>.



## I. Objetivos

Em Portugal, tal como em muitos outros países, a resistência aos antibióticos tem vindo a aumentar de uma forma dramática, nomeadamente a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, uma das classes mais usadas na terapêutica. O abastecimento público de água em relação à quantidade e qualidade é uma preocupação crescente da população, em função da escassez e deterioração da qualidade dos recursos de água. Quando a água para consumo humano não é tratada e se encontra imprópria pode conter microrganismos patogénicos ou substâncias químicas capazes de causar doenças ao homem, sendo estas denominadas doenças de veiculação hídrica <sup>2, 10</sup>.

Os principais microrganismos que se encontram presentes quando a água é imprópria para consumo são de origem fecal, sendo a maior parte microrganismos Gram-negativos. Estes microrganismos têm vindo a aumentar a sua resistência aos antimicrobianos, tornando-se um problema cada vez maior para a população e reportando-se cada vez mais casos de multirresistência bacteriana <sup>2, 14, 118</sup>.

Esta abordagem tem como objetivo:

- Análise Microbiológica de águas não tratadas para consumo humano
- Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de isolados de bacilos Gram-negativos isolados de águas não tratadas para consumo humano do Norte do País
- Detecção e caracterização dos mecanismos de resistência aos Beta-lactâmicos, nomeadamente ESBLs, Beta-lactamases do tipo AmpC e Carbapenemases
- Caracterização molecular dos mecanismos de resistência, nomeadamente a detecção de genes das famílias *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* e de genes determinantes da produção de AmpC plasmídica e associados a Carbapenemases

## II. Material e Métodos

### 1. Amostragem

Para o presente trabalho foram colhidas 42 amostras de água para consumo humano não tratadas, 20 amostras de poço, 16 amostras de fontanário e 6 amostras de minas (ilustração 5). As amostras foram recolhidas nas regiões de Lousada, Paredes, Valongo, Felgueiras, Paços de Ferreira, Vizela, Penafiel e Braga, sem qualquer tipo de tratamento realizado (tabela 5).

**Tabela 5 - Distribuição das amostras pela zona geográfica**

Concelho	Poço	Mina	Fontanário	Quantidade total de amostras de água
<b>Braga</b>	0	1	0	1
<b>Felgueiras</b>	1	1	0	2
<b>Lousada</b>	11	1	3	15
<b>Paços de Ferreira</b>	2	0	0	2
<b>Paredes</b>	3	2	11	16
<b>Penafiel</b>	1	0	0	1
<b>Valongo</b>	0	0	1	1
<b>Vizela</b>	2	1	1	4
<b>Total</b>	20	6	16	42

O critério de seleção das bactérias a isolar consistiu no crescimento em meio com antibiótico (ampicilina) através da técnica de filtração de membrana.



**Ilustração 5 – Exemplo de locais de amostragem**

## **2. Colheita das amostras**

Foram utilizados os seguintes materiais para colheita, registo, identificação e transporte das amostras dos diferentes locais de análise:

- Folha para o preenchimento dos dados do local da colheita das amostras;
- Arca com gelo (para a conservação das amostras durante o transporte para a análise laboratorial)
- As amostras de água para análise eram colhidas em frascos esterilizados, de vidro ou plástico com cerca de 600 ml de capacidade <sup>121</sup>

### **Descrição do procedimento:**

1. Colher a água da torneira habitualmente utilizada pelo consumidor
2. Deixar correr a água da torneira durante cerca de 3 minutos
3. Fechar a torneira e proceder à sua esterilização por flamejamento
4. Abrir a torneira e deixar correr fortemente a água, para que arraste as películas queimadas
5. Regularizar a saída da água
6. Destapar rapidamente o frasco, incliná-lo ligeiramente para evitar a contaminação com poeiras do ambiente e enchê-lo
7. Tapar imediatamente o frasco <sup>121</sup>

**Nota:** As amostras de água das fontes de abastecimento (minas e fontanários) foram colhidas diretamente da torneira <sup>121</sup>.

## **3. Análise Microbiológica**

As amostras foram analisadas pela técnica de filtração em membrana que consistiu na filtração de x ml de água sob vácuo na rampa de filtração através de uma membrana de éster de celulose ou acetato de celulose, dependendo o volume de água (ml) do meio onde se iria colocar a membrana <sup>5</sup>. A membrana colocada no meio de MacConkey resultou de 100 ml de água filtrada e a colocada no meio com Ampicilina resultou de 500 ml de água filtrada.

O volume de filtração era maior na membrana que era colocada no meio de MacConkey com antibiótico, porque com um volume maior de filtração foi possível isolar com maior eficácia as bactérias resistentes a antibióticos.

#### 4. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados era realizada inicialmente através do meio cromogénio, *Chromagar Orientation* que permitia isolar e direcionar a identificação das bactérias. A partir desta identificação presuntiva era determinado qual o melhor método para a identificação das bactérias. Se a família KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ou *Citrobacter*) utilizava-se a galeria API 20E, se resultado fosse uma bactéria não fermentadora utilizava-se o ID 32 GN.

*Chromagar Orientation* é um meio cromogénico direcionado para deteção de bactérias patogénicas presentes na urina. Neste trabalho, foi utilizado como um meio para orientação e posterior utilização das galerias Api 20 E ou ID 32 GN.

As galerias *Api 20 E* e *ID 32 GN* permitem a identificação dos bacilos Gram-negativos em 24 H permitem a identificação da maioria das bactérias encontradas na clínica, são de utilização fácil e rápida: 1 única colónia, indicações de utilização e interpretação com programa informático.

#### 5. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA)

O Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos, também conhecido por antibiograma, é uma técnica aplicada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* a agentes antimicrobianos. Esta técnica avalia diretamente a atividade antimicrobiana sobre determinado isolado, com a aplicação de antimicrobianos impregnados em discos de papel de filtro, sobre uma suspensão bacteriana espalhada no meio de *Mueller-Hinton*, utilizando a técnica de sementeira em toalha.

A técnica de difusão em agar exige que as instruções sejam cumpridas rigorosamente para que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais do *European Society of clinical Microbiology and infectious Diseases* (EUCAST) ou *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) <sup>122</sup>.

A escolha dos discos de antibiótico baseou-se na escolha de antibióticos em relação à família das *Enterobacteriaceae* estipulada no CLSI <sup>122</sup>.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos avaliados e concentrações foram as seguintes:

- **Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos:** ampicilina (AML) (10 $\mu$ g); amoxicilina e ácido clavulânico (AUG) (30 $\mu$ g); ceftazidima (CAZ) (30 $\mu$ g); cefotaxima (CTX) (30 $\mu$ g); cefepime (FEP) (30 $\mu$ g); aztreonamo (ATM) (30 $\mu$ g); cefoxitina (FOX) (30 $\mu$ g), imipenemo (IPM) (10 $\mu$ g), ertapenemo (ETP) (10 $\mu$ g), meropenemo (MRP) (10 $\mu$ g); doripenemo (DOR) (10  $\mu$ g)

- **Antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos:** gentamicina (CN) (10 $\mu$ g); tobramicina (TOB) (10 $\mu$ g); amikacina (AK) (30 $\mu$ g); tetraciclina (TE) (30 $\mu$ g); tigeciclina (TGC) (15 $\mu$ g); ciprofloxacina (CIP) (5 $\mu$ g); nitrofurantoína (F) (100  $\mu$ g); cloranfenicol (C) (30 $\mu$ g); trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) (50  $\mu$ g); Fosfomicina (FOS) (200  $\mu$ g)

Esta técnica avalia diretamente a atividade antimicrobiana sobre determinado isolado, com a aplicação de antimicrobianos impregnados em discos de papel de filtro colocados em meio agar *Mueller-Hinton*, produzindo em torno do disco, um gradiente decrescente de concentração do antimicrobiano. O teste permite classificar as bactérias como sensíveis, com sensibilidade intermediária ou resistentes aos antimicrobianos de acordo com o halo de inibição de crescimento formado e verificar a presença de sinergismo e/ou antagonismo, após 18h a 24h de incubação, a 37°C. <sup>123</sup>.

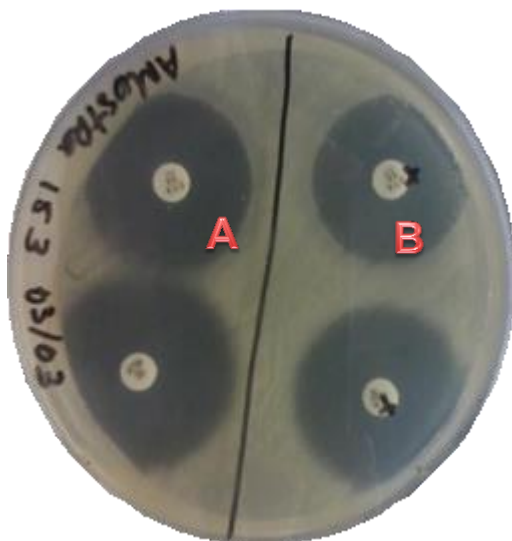
Na classificação da suscetibilidade de bactérias a antibióticos recorreu-se à verificação de valores de referência (standards), previamente tabelados, do diâmetro dos halos de inibição divulgados pelo CLSI <sup>122</sup>.

## 6. Pesquisa fenotípica de ESBLs

### 6.1. Método de difusão em disco

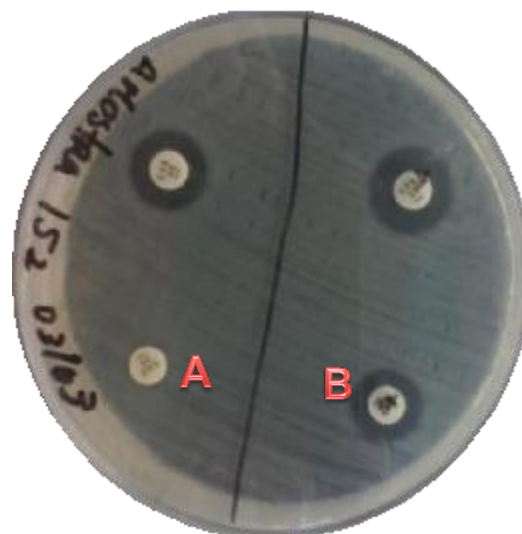
Esta técnica de fácil execução e interpretação permite detectar a presença de ESBLs nas estirpes em estudo. Para a realização desta técnica, prepara-se uma suspensão bacteriana com soro fisiológico, seguindo a escala de turvação de 0,5 de McFarland. Posteriormente inocula-se a suspensão em meio de *Mueller-Hinton*, utilizando a técnica de sementeira em toalha, de forma uniforme, com uma zaragatoa estéril. A detecção e/ou confirmação da presença de ESBLs consiste na visualização do aumento do halo de inibição do(s) oximino- $\beta$ -lactâmico(s) causado pelo sinergismo do ácido clavulânico no disco da Amoxicilina com ácido clavulânico <sup>88, 89</sup>.

Outra forma de proceder à detecção de ESBLs consiste na adição de 10  $\mu$ l de solução de ácido clavulânico (1000  $\mu$ g/ml) ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico com maior redução da suscetibilidade. Ao colocarmos, no disco com o antibiótico, o ácido clavulânico, um inibidor das  $\beta$ -lactamases, irá observa-se à volta dos discos um aumento do halo de inibição. Após incubação das placas a 37°C durante 24 horas, seguia-se a medição dos halos de inibição e leitura dos resultados utilizando as normas descritas no *CLSI*, ou seja, um aumento de  $\geq 5$ mm do diâmetro do disco de oximino- $\beta$ -lactâmico com o ácido clavulânico comparativamente ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico sem ácido clavulânico é sugestivo da presença de produção de ESBL (ilustração 6 e 7) <sup>67</sup>.



**Ilustração 6 – Resultado sugestivo de ausência de ESBL no isolado *E.coli* 30**

A – Disco de antibiótico CTX  
B - Disco de antibiótico CTX +Ácido Clavulânico



**Ilustração 7 – Resultado sugestivo de presença de ESBL no isolado *Citrobacter freundii* 31**

A – Disco de antibiótico CTX  
B - Disco de antibiótico CTX +Ácido Clavulânico

## 7. Pesquisa fenotípica de Carbapenemases

### 7.1. Método de Inativação de Carbapenemos (CIM)

Este teste foi utilizado em bactérias que apresentavam resistências aos carbapenemos com o objetivo de verificar a presença de um mecanismo degradativo dos carbapenemos <sup>124</sup>.

Inicialmente era realizada uma suspensão bacteriana de 0,5 na escala *McFarland*. Posteriormente era pipetado cerca de 400 ul da suspensão para um *eppendorf* e colocava-se a incubar com o disco de Meropenemo durante 2 horas a 37°C. Após a incubação, realizava-se uma suspensão bacteriana de *E.coli* ATCC 25922 e inoculava-se em meio de *Mueller-Hinton* através da técnica de sementeira. De seguida, colocava-se os discos de Meropenemo e ia incubar a 37°C durante 24h. Após este tempo de incubação, interpretavam-se os resultados (ilustração 8) <sup>124</sup>.

- Presença de halo de inibição de crescimento com o meropenemo: Sugestivo de ausência de Carbapenemase <sup>124</sup>.
- Ausência de halo de inibição de crescimento com o meropenemo: Sugestivo de presença de Carbapenemase <sup>124</sup>.



**Ilustração 8 - Interpretação de resultados do teste CIM**

A – Sugestivo de presença de carbapenemase

B – Sugestivo de ausência de carbapenemase

\*Adaptado de <sup>123</sup>

## **7.2. Teste com EDTA**

Este teste foi realizado quando existia redução da suscetibilidade aos carbapenemos e suspeita de M $\beta$ L. Os isolados com diferença de diâmetro  $\geq 5$  mm para o carbapenemo (imipenemo ou meropenemo) com EDTA em relação ao carbapenemo sem EDTA eram considerados potenciais produtores de M $\beta$ L (IMP, VIM, NDM) <sup>1, 67</sup>.

Com a realização deste teste era possível pressupor a presença de M $\beta$ L, mas somente através do PCR é que existe confirmação <sup>1, 67</sup>.

## **8. Pesquisa fenotípica de AmpC**

O método de *difusão em agar* foi utilizado também para a detecção da presença de AmpC nos isolados bacterianos, visto ser de fácil execução e interpretação. Utilizava-se o meio de *Mueller-Hinton* com cloxacilina e através da comparação com o antibiograma em meio *Muller-Hinton* sem antibiótico, era possível verificar a presença ou ausência de AmpC. Isolados apresentando sensibilidade à Cloxacilina, eram sugestivos da presença de AmpC <sup>67</sup>.

Apesar de não haver padronização e recomendação pelo *CLSI* para a detecção de  $\beta$ -lactamases AmpC, a triagem pode ser realizada pela diminuição da sensibilidade à cefoxitina e/ou presença de antagonismo (no caso de AmpC cromossômica) <sup>67</sup>.

## 9. Pesquisa Molecular de $\beta$ -lactamases

### 9.1. Fundamentos de PCR

As reações de amplificação por PCR foram preparadas utilizando os seguintes componentes: água ultra pura estéril, tampão da reação, cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), *primers* (*forward e reverse*), desoxirribunocleotídeos (dNTP's) e Taq polimerase para detecção de genes codificadores de carbapenemases e ESBLs).

A PCR ocorre em três etapas principais:

- Numa fase inicial, para que ocorra a **desnaturação** programou-se o termociclador a uma temperatura de 94°C.
- Numa segunda fase, ocorre a diminuição de temperatura para ocorrer a **hibridização dos primers** (de acordo com a temperatura ótima dos primers).
- Após a conclusão de todos os ciclos, aumenta-se a temperatura para os 72°C (temperatura ótima da enzima) para ocorrer a **extensão das cadeias**.

**NOTA:** No fim dos ciclos, programa-se o termociclador para os 12°C, de forma a conservar os produtos de amplificação, a tempo infinito <sup>125</sup>.

### 9.2. Extração de DNA

A produção de  $\beta$ -lactamases pode ser confirmada através de técnicas de biologia molecular, pelo que é necessário extrair o DNA dos isolados bacterianos. O método utilizado consistiu na realização de uma suspensão com uma ou duas colónias bacterianas em 100  $\mu\text{l}$  de água ultrapura. De seguida, as suspensões eram colocadas no termociclador à temperatura de 100°C durante 10 minutos e 4°C de tempo indefinido. Posteriormente, os lisados eram introduzidos na centrífuga a 10 000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Por fim, recolhia-se o sobrenadante, que contém o DNA, e congelava-se a -20°C para posterior análise, sempre em duplicado, afim de se resguardar a amostra em caso de perda <sup>125, 126</sup>.

### 9.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Utilizou-se esta técnica para a detecção de ESBLs, pesquisa de Carbapenemases e AmpC <sup>125</sup>.



### Pesquisa de ESBLs:

Preparou-se, uma mistura com 2 µl de DNA de cada isolado, 1,0 µl de cada primer (*Forward* (F) para a direção 5'→3' e *Reverse* (R) para a direção 3'←5'), 12,5 µl de uma solução comercial (MIX) de nucleótidos, Taq polimerase e tampão (*DNAzyme™ II 2x PCR Master Mix, Thermo Scientific*) e restante volume µl de água ultra pura estéril, para perfazer um volume total de 25 µl. De seguida, programou-se as condições de corrida no termociclador de acordo com a tabela 6 e 7 <sup>125</sup>:

- Multiplex TEM, SHV e OXA**

**Tabela 6 - Condições do PCR Multiplex TEM, SHV e OXA**

Condições					
Desnaturaçãoinicial	Desnaturaçãoinicial	Annealing	Extensão	Nº de ciclos	Extensão final
94°C – 7 minutos	94°C – 40 segundos	57°C – 40 segundos	72 °C – 1 minuto	30 x	72°C - 7 minutos

- Multiplex CTX-M (grupos 1, 2 , 8, 9 e 25) <sup>125</sup>**

**Tabela 7 - Condições do PCR Multiplex CTX-M (grupos 1, 2, 8, 9 e 25)**

Condições					
Desnaturaçãoinicial	Desnaturaçãoinicial	Annealing	Extensão	Nº de ciclos	Extensão final
94°C – 5 minutos	94°C – 25 segundos	52°C – 40 segundos	72 °C – 50 segundos	30 x	72°C - 6 minutos

Com recurso a primers adequados à deteção da presença de ESBLs, foram escolhidas as condições de amplificação descritas na tabela 8.

**Tabela 8 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene das ESBLs**

Gene amplificado	Primers	Sequência (5'-----3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM f	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800 pb	<sup>125</sup>
	TEM r	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV f	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713 pb	<sup>125</sup>
	SHV r	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	OXA f	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564 pb	<sup>125</sup>
	OXA r	GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	CTX-M-1 f	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC	415 pb	<sup>126</sup>
	CTX-M-1 r	AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	CTX-M-2 f	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552 pb	<sup>126</sup>
	CTX-M-2 r	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	CTX-M-8 f	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	666 pb	<sup>126</sup>
	CTX-M-8 r	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	CTX-M-9 f	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	205 pb	<sup>126</sup>
	CTX-M-9 r	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC		

<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	CTX-M-25 f	GCA CGA TGA CAT TCG GG	327 pb	126
	CTX-M-25 r	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C		

**Legenda:** F- forward; R- reverse

### Para pesquisa de Carbapenemases:

Preparou-se uma mistura com 2 µl de DNA de cada isolado, 1,25 µl de cada primer (*Forward* para a direção 5'→3' e *Reverse* para a direção 3'←5'), 12,5 µl de uma solução comercial (MIX) de nucleótidos, Taq polimerase e tampão (DNAzyme™ II 2x PCR Master Mix, Thermo Scientific) e restante volume(µl) de água ultra pura estéril, para perfazer um volume total de 25 µl. De seguida, programou-se as condições de corrida no termociclador apresentadas na tabela 9 <sup>127</sup>.

- **Multiplex Carbapenemases (NDM, VIM, IMP, KPC e OXA-48)**
- **Multiplex Carbapenemases (SPM, AIM, GIM, BIC, SIM e DIM)**

**Tabela 9 - Condições do PCR Multiplex para Carbapenemases (NDM, VIM, IMP, KPC, OXA-48 SPM, AIM, GIM, BIC, SIM e DIM)**

Condições					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Annealing	Extensão	Nº de ciclos	Extensão final
94°C – 10 minutos	94°C – 30 segundos	52°C – 40 segundos	72 °C – 50 segundos	36 x	72°C - 5 minutos

Com recurso a primers adequados à deteção da presença de Carbapenemases, foram escolhidas as condições de amplificação descritas na tabela 10.

**Tabela 10 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene das carbapenemases**

Gene amplificado	Primers	Sequência (5'-----3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP f	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232 pb	127
	IMP r	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM f	GATGGTGTGTTGGTCGCATA	390 pb	127
	VIM r	CGAATGCGCAGCACCAG		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC f	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798 pb	127
	KPC r	CTTGTCATCCTTGTAGGCG	232 pb	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48 f	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438 pb	127
	OXA-48 r	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM f	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621 pb	127
	NDM r	CGGAATGGCTCATCACGATC		

**Legenda:** F- forward; R- reverse

## Pesquisa de beta-lactamases do tipo AmpC:

Foi investigada da presença dos principais genes determinantes da produção de AmpC plasmidial (MOX, CMY, LAT, BIL, DHA, ACC, MIR, ACT e FOX), utilizando-se os primers específicos descritos na tabela 12. A PCR foi realizada em termociclador, de acordo com o protocolo para PCR multiplex descrito na tabela 11.

**Tabela 11 - Condições do PCR Multiplex para AmpC <sup>103</sup>**

Condições					
Desnaturaçãoinicial	Desnaturaçãoinicial	Annealing	Extensão	Nº de ciclos	Extensão final
94°C – 3 minutos	94°C – 30 segundos	64°C – 30 segundos	72 °C – 1 minuto	25 x	72°C - 7 minutos

**Tabela 12 - Tamanho de fragmento do amplicão de acordo com o gene**

Enzima	Primer	Sequência (5'----3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
<i>LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1</i>	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	103
	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC		
<i>ACC</i>	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	103
	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC		
<i>MIR-1T ACT-1</i>	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	103
	EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT		
<i>DHA-1, DHA-2</i>	DHAMF	ACA CTG ATT TCC GCT CTG CT	1043	103, 128
	DHAMR	ACA ATC GCC ACC TGT TTT TC		
<i>Regulador DHA</i>	AmpR (F)	CAG GGT AAA GCG GTG AAC AT	1738	103, 128
<i>AmpC</i>	ampC F	CCC CGC TTA TAG AGC AAC AA	634	129
	ampC R	TCA ATG GTC GAC TTC ACA CC		
<i>CMY</i>	CMY F	GGG CCC GGA CAC CYT TTT GC	1256	130
	CMY R	TAA GTG TAG ATG ACA RCA GG		

## 9.4. Identificação dos produtos de PCR por eletroforese

Após as reações terminarem, é necessário identificar os amplicões. Para isso, os produtos de PCR eram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%<sup>125, 127</sup>. Para a preparação do gel, pesava-se 1,5 gramas de agarose e diluía-se em 100 ml de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5 x, com o auxílio do micro-ondas. Adicionava-se posteriormente cerca de 6 µl de *Midori Green advance DNA stain* para posterior visualização no transiluminador de ultravioleta (UV). Por fim, esperava-se até o arrefecimento do gel, para o colocar numa tina de electroforese <sup>125, 127</sup>.

Nos poços, com a ajuda de uma micropipeta, pipetava-se 5 µl dos amplicões e colocava-se a correr a 80 Volts durante sensivelmente 60 e 30 minutos para ESBLs e

Carbapenemases/AmpC, respectivamente. Posteriormente, visualizava-se e identificava-se os amplicões através do transiluminador UV <sup>125, 127</sup>.

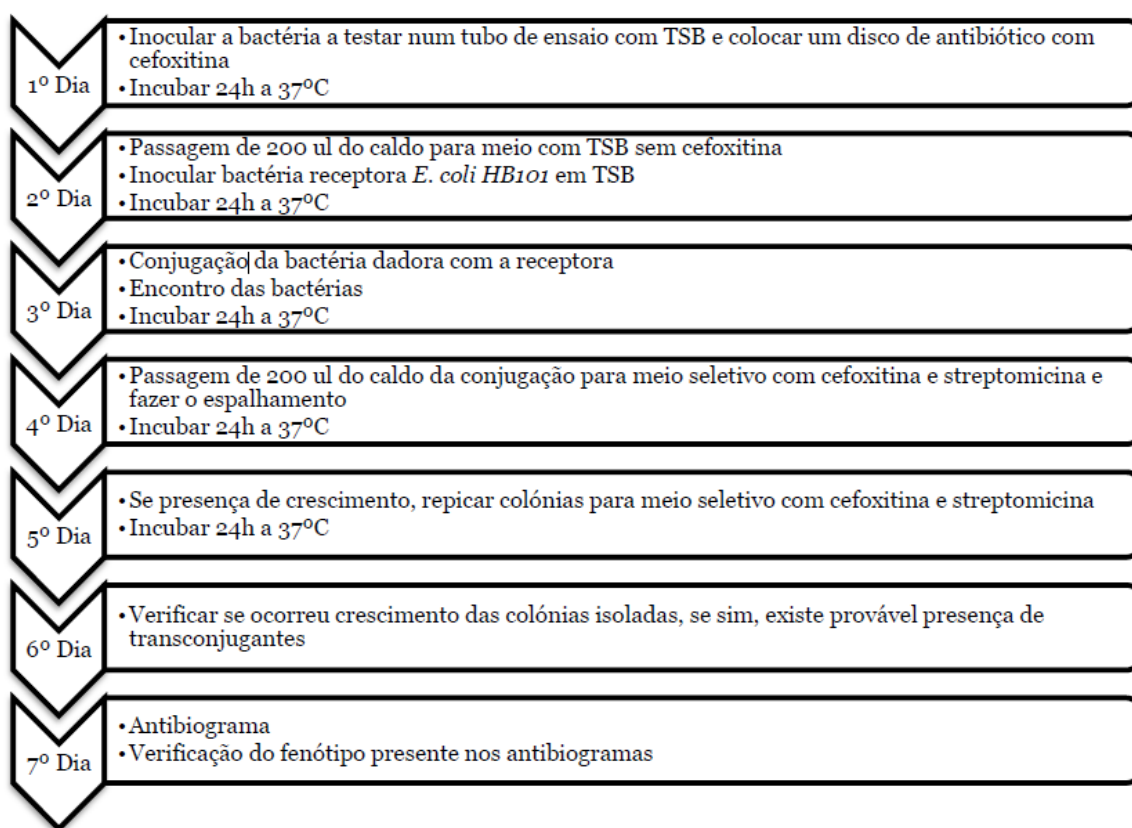
Os resultados foram validados pela ausência de amplificação no controlo negativo, composto por água ultra pura estéril, e por comparação dos fragmentos amplificados com o marcador de peso molecular utilizado.

## 10. Conjugação

A transferência do material genético por conjugação é um processo complexo. Este processo engloba a presença de duas estirpes, a estirpe dadora, que contém o plasmídeo da resistência, enquanto que a estirpe receptora não tem.

Durante a conjugação, as bactérias dadoras sintetizam um pílus modificado através do qual o material genético é transferido, quando se liga à bactéria receptora. Uma cadeia de DNA do plasmídeo é transferida para a bactéria receptora F, onde a cadeia complementar será sintetizada.

No esquema abaixo encontra-se descrito os passos efetuados na técnica de conjugação <sup>103</sup>.



**Ilustração 9** - Descrição da técnica de conjugação

### III. Resultados e Discussão

#### 1. Isolados bacterianos e tipo de colheita

As amostras foram obtidas de diferentes locais: poço (47.62%), fontanário (38.10%) e mina (14.29%) como se verifica no gráfico 1. Todas as águas colhidas eram águas sem qualquer tipo de tratamento, utilizadas para alimentação, higiene e utilização doméstica. É de salientar que uma parte da população cujas águas foram analisadas, não tinham saneamento básico e a água canalizada era de poço, o que revela a necessidade de verificar a qualidade microbiológica destas águas, visto serem a única origem de água usada por estas pessoas.

As amostras de água de origem pública contempla as águas de fontanários e minas e de origem privada, os poços.

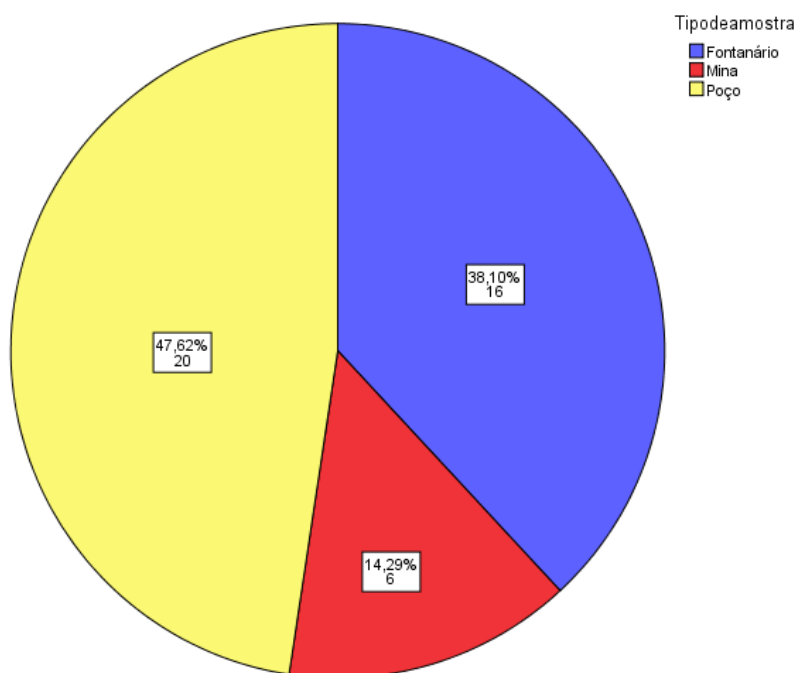


Gráfico 1 - Distribuição das amostras colhidas pelos locais de amostragem

## 2. Análise Microbiológica das amostras

Ao realizar a avaliação microbiológica (tabela 13) pode-se concluir que as águas para consumo humano não tratadas apresentam carga microbiana considerável. Além disso, por vezes, a água pode apresentar bactérias fermentadoras da lactose sem a presença de bactérias não fermentadoras e vice-versa. Isto pode ser indicativo de que realmente as bactérias coliformes, bactérias indicadoras de contaminação fecal, podem não ser boas indicadoras no que diz respeito à segurança da água, do ponto de vista da resistência das bactérias aos antibióticos.

Na tabela 13 estão sistematizados os resultados obtidos da avaliação da qualidade microbiológica mediante o tipo de amostra e localização geográfica.

**Tabela 13 - Avaliação da qualidade microbiológica das águas para consumo humano não tratadas**

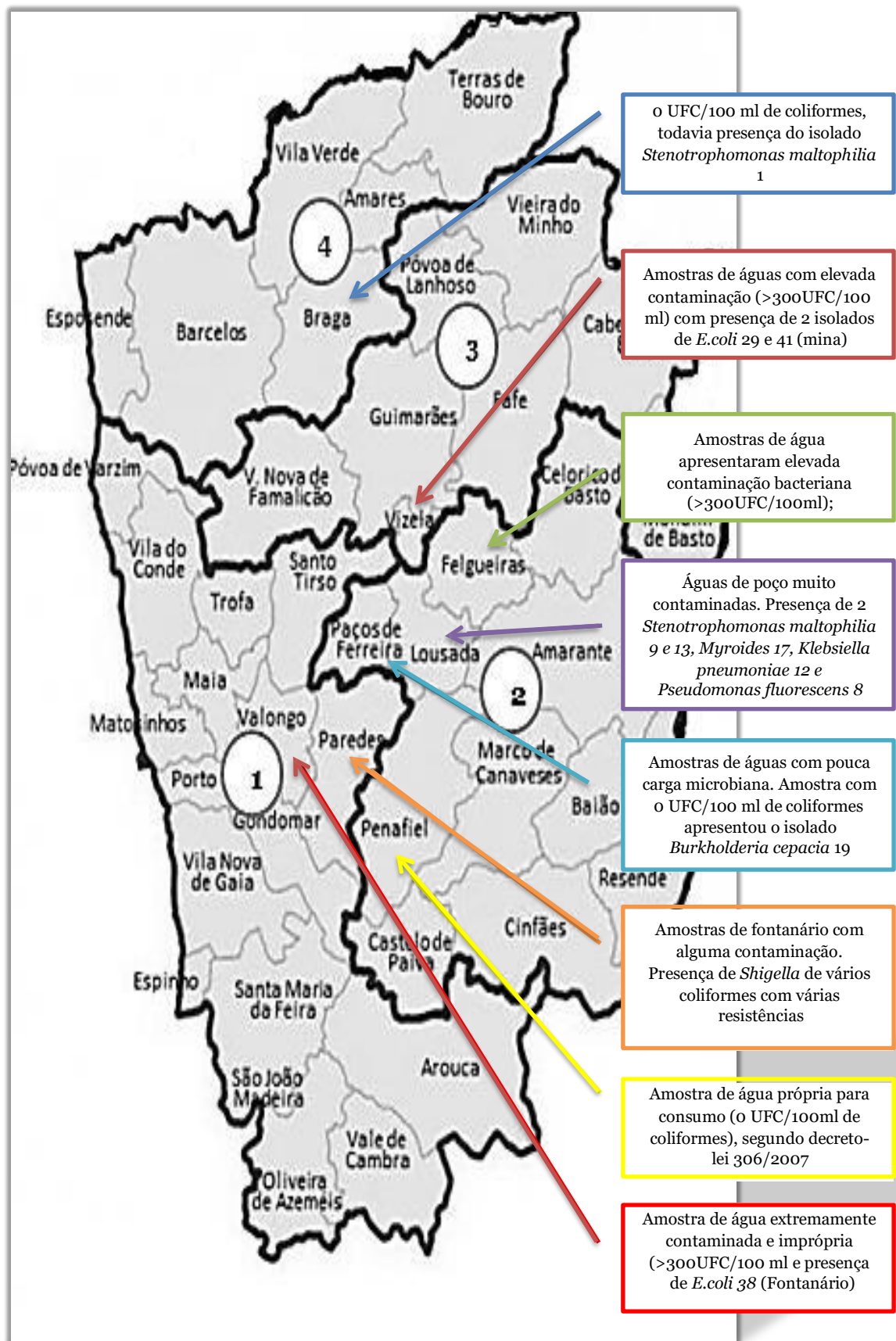
Tipo de Amostra	Coliformes (UFC/100 ml)	Não coliformes (UFC/100 ml)	Localização Geográfica	Amostra	Isolados*
Mina	0	6	Braga	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Poço	>300	>300	Felgueiras	2	<i>Proteus vulgaris</i>
Mina	30	>300	Felgueiras	3	<i>Citrobacter freundii</i> ; <i>Morganella morganii</i> ;
Poço	2	25	Lousada	4	
Poço	19	4	Lousada	5	
Mina	0	>300	Lousada	6	
Poço	>300	>300	Lousada	7	<i>Enterobacter cloacae</i>
Poço	45	>300	Lousada	8	<i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Poço	>300	>300	Lousada	9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Poço	0	25	Lousada	10	
Poço	>300	>300	Lousada	11	<i>Proteus vulgaris</i>
Poço	3	0	Lousada	12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Poço	>300	>300	Lousada	13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Citrobacter rodentium</i>
Poço	0	0	Lousada	14	
Poço	0	0	Lousada	15	
Fontanário	1	0	Lousada	16	
Fontanário	6	3	Lousada	17	<i>Myroides</i>
Fontanário	0	5	Lousada	18	
Poço	0	2	Paços de Ferreira	19	<i>Burkholderia cepacia</i>
Poço	2	0	Paços de Ferreira	20	
Poço	4	3	Paredes	21	<i>Citrobacter freundii</i>

Fontanário	10	>300	Paredes	22	<i>Proteus vulgaris</i>
Fontanário	0	0	Paredes	23	
Fontanário	0	1	Paredes	24	
Poço	>300	>300	Paredes	25	<i>Enterobacter cloacae</i>
Fontanário	0	0	Paredes	26	
Fontanário	>300	>300	Paredes	27	<i>Enterobacter cloacae</i>
Fontanário	2	0	Paredes	28	
Fontanário	33	5	Paredes	29	<i>Shigella;</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Fontanário	45	8	Paredes	30	<i>E.coli</i>
Poço	0	69	Paredes	31	
Fontanário	23	50	Paredes	32	<i>Citrobacter freundii</i>
Fontanário	11	10	Paredes	33	
Mina	4	49	Paredes	34	<i>Citrobacter braakii;</i> <i>Citrobacter freundii;</i>
Mina	0	34	Paredes	35	
Fontanário	16	>300	Paredes	36	<i>Klebsiella rhinoschleromatis</i>
Poço	0	58	Penafiel	37	
Fontanário	>300	>300	Valongo	38	<i>Pantoea; Cedecea;</i> <i>E.coli;</i>
Poço	>300	>300	Vizela	39	<i>E.coli</i>
Fontanário	1	>300	Vizela	40	
Mina	25	>300	Vizela	41	<i>E.coli;</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
Poço	0	>300	Vizela	42	

**Legenda:** Verde – valores paramétricos; Amarelo – valor aceitável; Laranja - Valores de risco; Vermelho - Valores de risco elevado

\*Isolados selecionados com resistência à ampicilina

As amostras de água foram recolhidas de várias zonas do norte do país, nomeadamente da área Metropolitana do Porto, Alto do Tâmega, Cávado e Ave. Na ilustração 10 a seguir, pode-se observar o mapa com estas regiões e visualizar as principais ilações retiradas através da leitura dos dados da tabela 13.



**Ilustração 10 - Mapa da zona Norte com principais resultados por zonas geográficas**  
**Legenda:** 1 – Área Metropolitana do Porto; 2- Alto Tâmega; 3- Ave; 4- Cávado



Continuando a análise da tabela 13, de um modo geral todas as amostras de água de Mina apresentavam uma vasta quantidade de UFC (Unidades formadoras de colónias) por 100 ml de água, especialmente bactérias não fermentadoras da lactose.

Para verificar quais as zonas, de águas não tratadas para consumo humano, que apresentam maior risco do ponto de vista da saúde pública, estas foram avaliadas mediante águas de origem pública (tabela 14) e privada (tabela 15). As águas privadas consumidas são da responsabilidade do proprietário do poço.

**Tabela 14 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas de origem pública**

Tipo de Amostra	Coliformes (UFC/100 ml)	Não coliformes (UFC/100 ml)	Localização Geográfica	Amostra	Isolados*
Fontanário	1	0	Lousada	16	
Fontanário	6	3	Lousada	17	<i>Myroides</i>
Fontanário	0	5	Lousada	18	
Fontanário	10	>300	Paredes	22	<i>Proteus vulgaris</i>
Fontanário	0	0	Paredes	23	
Fontanário	0	1	Paredes	24	
Fontanário	0	0	Paredes	26	
Fontanário	>300	>300	Paredes	27	<i>Enterobacter cloacae</i>
Fontanário	2	0	Paredes	28	
Fontanário	33	5	Paredes	29	<i>Shigella;</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Fontanário	45	8	Paredes	30	<i>E.coli</i>
Fontanário	23	50	Paredes	32	<i>Citrobacter freundii</i>
Fontanário	11	10	Paredes	33	
Fontanário	16	>300	Paredes	36	<i>Klebsiella rhinoschleromati</i> <i>S</i>
Fontanário	>300	>300	Valongo	38	<i>Pantoea;</i> <i>Cedecea; E.coli;</i>
Fontanário	1	>300	Vizela	40	
Mina	0	6	Braga	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Mina	30	>300	Felgueiras	3	<i>Citrobacter freundii;</i> <i>Morganella morgani;</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Mina	0	>300	Lousada	6	
Mina	4	49	Paredes	34	<i>Citrobacter braakii;</i> <i>Citrobacter freundii;</i>
Mina	0	34	Paredes	35	
Mina	25	>300	Vizela	41	<i>E.coli;</i> <i>Pseudomonas spp.</i>

**Legenda:** Verde – valores paramétricos; Amarelo – valor aceitável; Laranja - Valores de risco; Vermelho - Valores de risco elevado

\*Isolados seleccionados com resistência à ampicilina

Analisando a tabela 14, pode-se concluir que em:

- **Braga**

Segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, a água proveniente desta zona encontra-se própria para consumo humano. Contudo, após análise da suscetibilidade aos antibióticos (tabela 19), isolou-se *Stenotrophomonas maltophilia* 1, bactéria com multirresistência e problemática principalmente em unidades de cuidados de saúde <sup>60, 72, 137</sup>.

- **Felgueiras**

A água da mina apresenta valores de não coliformes >300UFC/100 ml e 30UFC/100 ml de coliformes, sendo também uma água com risco para a saúde pública.

- **Lousada**

No concelho de Lousada foram analisadas 4 amostras de água de origem pública. Uma das amostras de água foi de uma mina que apresentou o UFC/100 ml de coliformes, logo segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, encontra-se própria para consumo. Contudo, apresenta elevada carga de não coliformes >300UFC/100 ml, sugestivo de contaminação ambiental.

Foram analisadas 3 amostras de água de fontanário, que apresentaram pouca carga microbiana, um deles isento de coliformes, sendo águas próprias para consumo. Contudo apresentou o isolado *Myroides*, que do ponto de vista de resistência aos antibióticos (tabela19), é relevante <sup>76</sup>.

- **Paredes**

As amostras de água analisadas aos 11 fontanários desta zona, apresentaram pouco crescimento bacteriano, contudo foram isolados, *E.coli* 30, *Citrobacter freundii* 29, 32 e *Klebsiella rhinoschleromatis* 36, coliformes que apresentaram resistência relevante (tabela 18) e presença de *Proteus vulgaris* 22 e *Shigella* 29 (agente patogénico). Um destes fontanários apresentou quantidade de coliformes e não coliformes >300UFC/100 ml, ou seja, grande contaminação, isolando-se *Enterobacter cloacae* 27 com alguma resistência.

Foram analisadas duas minas, uma apresentava o UFC/100 ml de coliformes, logo segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto confere água própria para consumo.

A outra apresentou 4UFC/100 ml de coliformes, sendo isolado *Citrobacter freundii* e *Citrobacter braakii*, apresentando resistência intrínseca à cefoxitina.

- **Valongo**

A única amostra de Valongo foi proveniente de um fontanário. Esta água apresentou-se contaminada, >300UFC/100 ml de coliformes e não coliformes, constituindo um risco para quem a consome. Além disso, foi isolada *E.coli* 38, o que segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto portanto água imprópria para consumo.

- **Vizela**

Desta zona foram provenientes 4 amostras de água. A amostra de água de mina apresentou elevada carga microbiana e presença de *E.coli* 41, encontrando-se imprópria para consumo. A água de fontanário apresenta elevada carga microbiana, sendo sugestivo de contaminação ambiental, pois o número de não coliformes é > 300 UFC/100 ml, não devendo ser consumida por apresentar risco para a saúde.

**Tabela 15 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas de origem privada**

Tipo de Amostra	Coliformes (UFC/100 ml)	Não coliformes (UFC/100 ml)	Localização Geográfica	Amostra	Isolados*
Poço	>300	>300	Felgueiras	2	<i>Proteus vulgaris</i>
Poço	2	25	Lousada	4	
Poço	19	4	Lousada	5	
Poço	>300	>300	Lousada	7	<i>Enterobacter cloacae</i>
Poço	45	>300	Lousada	8	<i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Poço	>300	>300	Lousada	9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Poço	0	25	Lousada	10	
Poço	>300	>300	Lousada	11	<i>Proteus vulgaris</i>
Poço	3	0	Lousada	12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Poço	>300	>300	Lousada	13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Citrobacter rodentium</i>
Poço	0	0	Lousada	14	
Poço	0	0	Lousada	15	
Poço	0	2	Paços de Ferreira	19	<i>Burkholderia cepacia</i>
Poço	2	0	Paços de Ferreira	20	

Poço	4	3	Paredes	21	<i>Citrobacter freundii</i>
Poço	>300	>300	Paredes	25	<i>Enterobacter cloacae</i>
Poço	0	69	Paredes	31	
Poço	0	58	Penafiel	37	
Poço	>300	>300	Vizela	39	<i>E.coli</i>
Poço	0	>300	Vizela	42	

**Legenda:** Verde – valores paramétricos; Amarelo – valor aceitável; Laranja - Valores de risco; Vermelho - Valores de risco elevado

\*Isolados selecionados com resistência à ampicilina

Analisando a tabela 15, águas privadas, provenientes de poços, pode-se concluir que em:

- **Felgueiras**

A amostra de água do poço apresentava quantidades de coliformes e não coliformes >300 UFC/100 ml, conferindo uma água muito contaminada e imprópria para consumo.

- **Lousada**

No concelho de Lousada foram analisadas 11 amostras de águas de poço. Três dessas amostras apresentaram o UFC/100 ml de água, logo segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, encontram-se próprias para consumo e duas outras amostras apresentavam carga microbiana reduzida, sendo próprias para consumo humano.

Cinco amostras de águas de poço com elevada carga de coliformes e não coliformes >300 UFC/100 ml, apresentaram isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter rodentium* e *Klebsiella oxytoca*, sendo impróprias para consumo humano e de risco para a saúde dos utilizadores.

Uma outra água de poço apresentou 0 UFC/100 ml de não coliformes e 3 UFC/100 ml de coliformes, ou seja, carga microbiana reduzida, com suposto risco reduzido para a saúde. Porém, nesta água foi isolada *Klebsiella pneumoniae* 12<sup>61</sup>.

Os poços desta zona situam-se quase sempre no quintal, onde existe cultivo de produtos alimentares, bem como utilização de fertilizantes e estrume (ilustração 11).



**Ilustração 11 – Localização de poço em Lousada junto ao quintal**

- **Paços de Ferreira**

Desta zona foram provenientes duas amostras de água de poço. Ambas apresentaram baixa carga microbiana, contudo uma das amostras que segundo o Decreto- Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto se encontra própria para consumo, oUFC/100 ml, foi isolado *Burkholderia cepacia* 19, bactéria patogénica e com elevada resistência aos antibióticos (tabela 19).

- **Paredes**

Foram analisadas três amostras de poço. Uma delas apresentou elevada quantidade de coliformes e não coliformes (>300 UFC/100 ml), encontrando-se imprópria para consumo. Neste poço foi isolado o *Enterobacter cloacae* 25 que apresentou resistência considerável. As outras duas amostras de água de poço apresentaram poucos coliformes, uma delas o UFC/100 ml encontrando-se própria para consumo e a outra apresentava 4 UFC/100 ml de coliformes, do ponto de vista microbiológico com reduzida contaminação, todavia apresentou o isolado *Citrobacter freundii* 21 com resistência relevante.

- **Penafiel**

A amostra de água desta zona foi de um poço e segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, encontra-se própria para consumo, oUFC/100 ml de coliformes.

- **Vizela**

Desta zona foram provenientes 4 amostras de água. Duas amostras de poço, uma delas segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, própria para consumo e a outra com valores de coliformes e não coliformes >300UFC/100 ml, sendo identificada *E.coli* 39, portanto segundo o mesmo decreto, encontra-se imprópria para consumo.

Em suma, analisando as amostras e comparando as tabelas 14 e 15 constata-se que as amostras de água de origem privada, os poços, estão muito contaminadas, com bactérias patogénicas, indicadores de contaminação fecal, sobretudo no concelho de Lousada. Este facto pode ser explicado pela atividade predominante que existia nesta zona, ou seja, a maioria tinha como profissão a agricultura e criação de gado. Além disso, a localização dos poços é predominantemente no quintal, onde cultivam alguns produtos alimentares (ilustração 11).

A presença de *Shigella* num fontanário em Paredes é relevante, contudo, neste fontanário foram realizadas análises e colocada a placa “água não controlada” (ilustração 12). Este facto é importante, pois este fontanário, dos analisados, foi o único que apresentava análises realizadas e placa.

O mesmo se verifica em relação aos poços, todas as águas avaliadas neste estudo são utilizadas para consumo humano, visto que a maioria da população que consome estas águas não têm saneamento básico e somente água distribuída a partir dos poços, recorrendo então aos poços privados como única fonte de água.

## Estudos de Caso

Estudo caso de Beire, uma freguesia portuguesa do concelho de Paredes, distrito Porto com 3,38 km<sup>2</sup> de área e 2 040 habitantes e que pertence à área Metropolitana do porto (tabela 16). Esta região não tem acesso ao saneamento básico e a água canalizada que tem vem diretamente da água do poço, sem qualquer tipo de tratamento antes de ser distribuída por toda a casa. A água nesta região é utilizada para fins domésticos e como alimento.

**Tabela 16 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas na região de Beire**

Tipo de Amostra	Coliformes (UFC/100 ml)	Não coliformes (UFC/100 ml)	Localização Geográfica	Amostra	Isolados*
Poço	4	3	Paredes	21	<i>Citrobacter freundii</i>
Poço	>300	>300	Paredes	25	<i>Enterobacter cloacae</i>
Fontanário	>300	>300	Paredes	27	<i>Enterobacter cloacae</i>
Fontanário	33	5	Paredes	29	<i>Shigella</i> ; <i>Citrobacter freundii</i>
Fontanário	45	8	Paredes	30	<i>E.coli</i>
Poço	0	69	Paredes	31	
Fontanário	11	10	Paredes	33	
Mina	4	49	Paredes	34	<i>Citrobacter braakii</i> ; <i>Citrobacter freundii</i> ;

**Legenda:** Verde – valores paramétricos; Amarelo – valor aceitável; Laranja - Valores de risco; Vermelho - Valores de risco elevado

\*Isolados seleccionados com resistência à ampicilina

Analisando a tabela 16, constata-se carga microbiana considerável, com isolados coliformes na maioria, excepto *Shigella* que é um agente patogénico. A presença destes coliformes indica contaminação fecal, presença predominante de *Citrobacter* e colonizadores intestinais. Este facto é importante, visto que como estas águas são utilizadas diariamente por esta população, a colonização intestinal pode-se verificar e as resistências associadas a estes coliformes (tabela 18) é muito relevante.

Um facto interessante é a situação distinta destes dois fontanários de Beire. Um por um lado tem análises microbiológicas realizadas e apresenta indicação de água não controlada (ilustração 12), tendo sido isolado *Shigella* durante este estudo. Por outro lado, o outro fontanário não apresenta nenhuma indicação (ilustração 13), tendo sido isolado *Enterobacter cloacae* com resistência relevante.





**Ilustração 12 – Placa indicativa de água não controlada**



**Ilustração 13 – Fontanário com presença de elevada carga microbiana (>300UFC/100 ml) de coliformes e não coliformes**



Estudo caso de Silvares, uma freguesia portuguesa do concelho de Lousada, distrito Porto com 5,75 km<sup>2</sup> de área e 3 207 habitantes e que pertence à área do Alto Tâmega (tabela 17). Esta região não tem acesso ao saneamento básico e a água canalizada que tem vem diretamente da água do poço, sem qualquer tipo de tratamento antes de ser distribuída por toda a casa. A água nesta região é utilizada para fins domésticos e como alimento e da responsabilidade do utilizador.

**Tabela 17 - Avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano não tratadas na região de Silvares**

Tipo de Amostra	Coliformes (UFC/100 ml)	Não coliformes (UFC/100 ml)	Localização Geográfica	Amostra	Isolados*
Poço	>300	>300	Lousada	7	<i>Enterobacter cloacae</i>
Poço	45	>300	Lousada	8	<i>Klebsiella oxytoca</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Poço	3	0	Lousada	12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Poço	>300	>300	Lousada	13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Citrobacter rodentium</i>

**Legenda:** Verde – valores paramétricos; Amarelo – valor aceitável; Laranja - Valores de risco; Vermelho - Valores de risco elevado

\*Isolados selecionados com resistência à ampicilina

Os quatro poços analisados da região de Silvares apresentam elevada contaminação bacteriana e presença de isolados com resistência relevante.

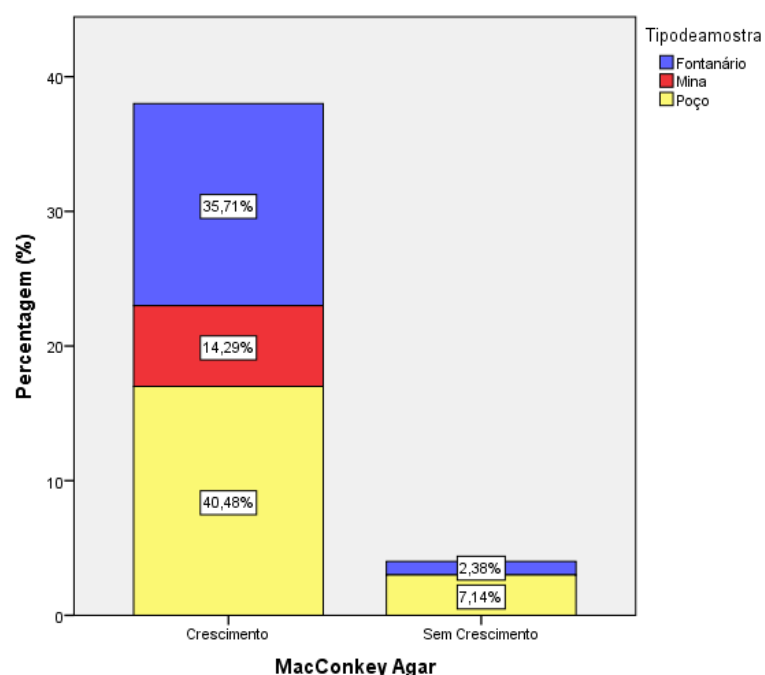
A atividade que predominava antigamente era a agricultura e criação de gado, o que pode ajudar a justificar esta elevada contaminação.

De realçar que, a água do poço que apresentou 45 UFC/100 ml de coliformes e >300 UFC/100 ml de não coliformes, a proprietária informou que um familiar que consumiu esta água adoeceu. Observando os isolados, *Klebsiella oxytoca* 8 e *Pseudomonas fluorescens* 8 e relacionando com a resistência que apresentam, é justificativo de grande preocupação.

Estas duas realidades (tabela 16 e 17) demonstram contaminação fecal, presença de microrganismos patogénicos e microrganismos oportunistas com resistências relevantes e potenciais colonizadores intestinais e elevado risco em termos de instalação de surtos de infeções na prestação de cuidados de saúde aquando admissão hospitalar.

É preocupante que, na atualidade, existam zonas que não apresentem saneamento básico nem distribuição de água às residências. Esta realidade tem impacto direto nestas populações que tem unicamente como origem de água, os poços.

Para verificar a contaminação microbiológica das águas não tratadas foi realizado o gráfico 2 que indica que cerca de 90,48% das águas analisadas apresentavam crescimento em meio de MacConkey. De facto, esta evidência já era de esperar visto que foram realizadas análises microbiológicas a águas não tratadas e devido à existência de flora microbiana associada à água. Todavia, quantidade superior a 300 UFC/100 ml é preocupante, pois é sugestivo de contaminação e falta de higiene, ou seja, um indício da possibilidade de estarem presentes bactérias patogénicas.



**Gráfico 2 - Distribuição das amostras com presença/ausência de crescimento em meio de MacConkey pelos locais de amostragem**

A presença de uma elevada flora microbiana, não garante que a água se encontre imprópria para consumo, contudo elevadas quantidades de bactérias podem trazer riscos para a saúde, pois existe grande probabilidade de algumas dessas bactérias serem patogénicas e oportunistas, podendo desenvolver patologias graves nos seres humanos.

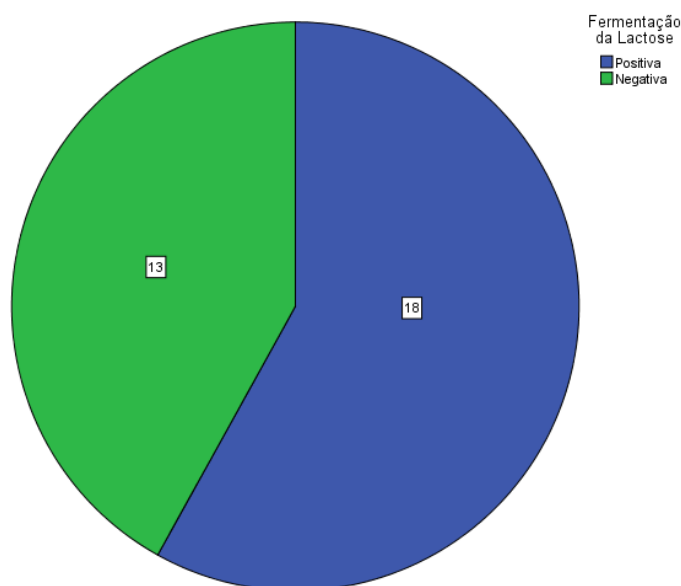
Segundo o decreto-lei nº 306/ 2007 de 27 de agosto, sendo os coliformes indicadores de contaminação fecal, a sua presença pode indicar presença de bactérias patogénicas, o que seria um fator de risco para a saúde pública. Contudo, a presença de coliformes totais, não significa necessariamente contaminação fecal, porém é um importante indicador das condições higiénicas do processo. Quanto mais elevada for a quantidade de coliformes totais e não coliformes, maior probabilidade de estarem presentes bactérias patogénicas. Além disso, os coliformes incluem membros da família

*Enterobacteriaceae*, por exemplo, *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* e *Klebsiella*, que presentes na água são responsáveis por uma variedade de doenças como a cólera, a febre tifóide, disenterias, entre outros <sup>131</sup>.

Em resumo, analisando microbiologicamente as águas de consumo humano não tratadas fica evidente de que apresentam uma elevada carga microbiana, podendo desencadear surtos ou colonizar o intestino humano, provocando doenças. Uma solução, principalmente para as pessoas que utilizam a água de poço como única origem, seria colocar cloragem ou um sistema de tratamento das águas, antes de estas serem distribuídas por toda a habitação.

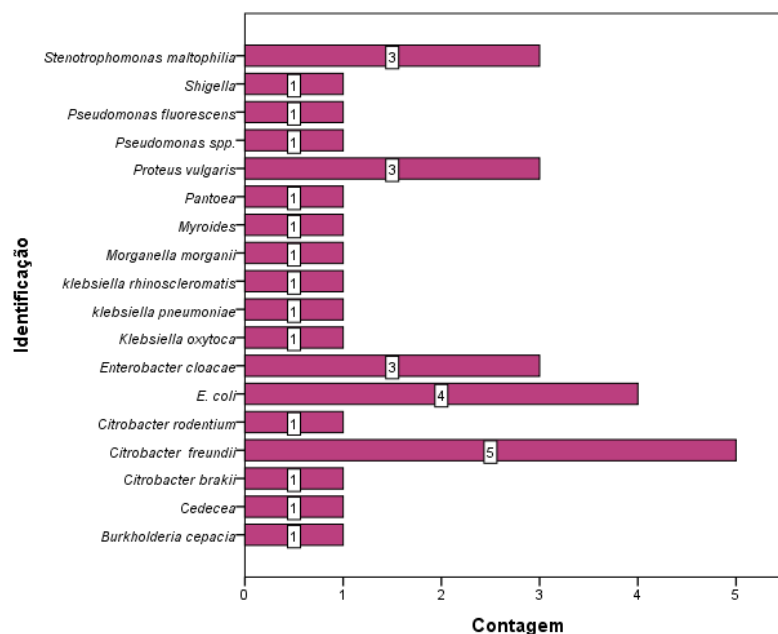
### 3. Análise da suscetibilidade dos isolados microbianos aos antibióticos

No gráfico 3 estão identificadas as bactérias com maior relevância relativamente à resistência aos antibióticos, bem como a sua contagem, tendo sido isoladas 31 bactérias Gram-negativas fermentadoras da lactose (n=18) e não fermentadoras da lactose (n=13).



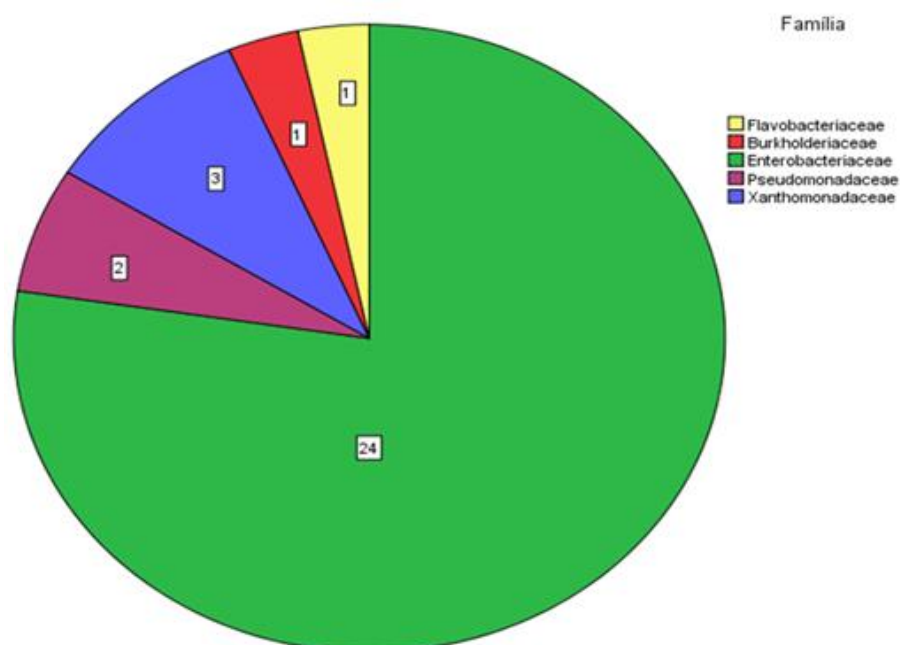
**Gráfico 3 - Distribuição dos isolados pelo tipo de fermentação da lactose**

Analisando o gráfico 4, verifica-se a presença de *Citrobacter freundii* em maior quantidade, o que se comprova em alguns estudos <sup>132</sup>.



**Gráfico 4 - Distribuição após seleção dos isolados pré-selecionados com ampicilina**

A maioria das bactérias identificadas pertence à família *Enterobacteriaceae*, família de bactérias Gram-negativas muito abundante, incluindo uma grande variedade de bactérias patogênicas e oportunistas para o ser humano (gráfico 5).



**Gráfico 5 - Distribuição das bactérias isoladas por família**

Nas tabelas 18 e 19 estão apresentados os resultados mais relevantes da análise microbiológica e de suscetibilidade aos antibióticos, realizada nas águas de consumo humano, públicas e privadas, não tratadas do Norte do País.

**Tabela 18 – Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *Enterobacteriaceae* estudados**

Identificação	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo em mm)											Antibióticos não $\beta$ -lactâmicos (halo em mm)									
	AML	AUG	CTX	CAZ	FEP	ATM	FOX	IMI	ETP	MRP	DORI	CIP	CN	AK	TOB	FOS	TE	TGC	STX	C	F
<i>Cedecea</i> 38	6	6	20	18	32	24	6	27													
<i>Citrobacter braakii</i> 34	18	6	24	22	32	32	11	24	30	30	26	36	22	20	22	28	24	25	38	29	26
<i>Citrobacter freundii</i> 3 <sup>1</sup>	6	6	7	6	24	11	6	21	20	19	14	20	17	16	16	19	13	16	19	16	15
<i>Citrobacter freundii</i> 21	6	6	8	6	27	14	6	24	20	22	18	22	20	19	21	22	19	20	24	21	20
<i>Citrobacter freundii</i> 29	6	6	16	16	29	20	6	26				28									
<i>Citrobacter freundii</i> 32	6	6	11	9	30	18	9	24	26	30	30	31	22	20	22	38	22	27	34	23	28
<i>Citrobacter freundii</i> 34	6	6	18	18	38	30	6	26	34	29	27	38	26	22	26	28	23	26	38	28	26
<i>Citrobacter rodentium</i> 13	6	6	19	19	30	22	8	22													
<i>E. coli</i> 30	6	14	20	32	38	32	28	24				26									
<i>E. coli</i> 38	6	16	30	32	40	38	32	34													
<i>E. coli</i> 39	14	20	40	40	38	38	24	40													
<i>E. coli</i> 41	6	14	38	38	36	32	30	38													
<i>Enterobacter cloacae</i> 7	6	7	16	17	30	21	6	26	26	34	32	33	24	26	42	6	28	28	36	40	40
<i>Enterobacter cloacae</i> 25	6	6	7	11	32	16	6	23	24	40	30	40	30	36	40	30	28	28	40	40	34
<i>Enterobacter cloacae</i> 27	6	6	14	15	35	17	6	25	20	30	30	44	32	30	30	20	20	30	38	24	30
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	28	24	44	34	28	24	30													
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	9	25	13	6	11	6	7	9	20	17	21	10	17	20	24	36	27	29
<i>Klebsiella rhinoschleromatis</i> 36	6	6	16	16	34	19	6	26	26	27	26	34	32	26	28	14	21	26	36	26	30
<i>Morganella morganii</i> 3	6	6	16	20	32	26	14	20	22	25	22	30	23	23	27	19	6	20	36	23	26
<i>Pantoea</i> 38	6	6	9	9	32	20	6	29													
<i>Proteus vulgaris</i> 2	6	6	20	20	34	25	6	30													

<i>Proteus vulgaris</i> 11	6	6	25	36	42	39	24	28	33												
<i>Proteus vulgaris</i> 22	7	20	23	30	28	20	14	42	20												
<i>Shigella</i> 29	6	10	22	22	40	28	20	20				40									

**Legenda:** antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: AUG - amoxicilina com ácido clavulânico; AML – ampicilina; CTX – cefotaxima; CAZ – ceftazidima; FEP – cefepime; ATM - aztreonam, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenemo; ETP – Ertapenemo; DORI – Doripenemo; antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos: CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; AK – amicacina; TOB – tobramicina; FOS – Fosfomicina; TE - tetraciclina, TGC – tigeciclina; STX - Sulfametoxazol + Trimetoprim; F - nitrofurantoína; C – cloranfenicol; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**;

**Tabela 19 - Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de Não-Enterobacteriaceae estudados**

Identificação	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo em mm)											Antibióticos não $\beta$ -lactâmicos (halo em mm)									
	AML	AUG	CTX	CAZ	FEP	ATM	FOX	IMI	ETP	MRP	DORI	CIP	CN	AK	TOB	FOS	TE	TGC	STX	C	F
<i>Burkholderia cepacia</i> 19	6	6	22	31	16	27	7	12	13	20	12	20	14	16	19	6	20	33	32	28	6
<i>Myroides</i> 17	11	6	12	24	30	8	6	36	25	30	26	32	24	24	20	6	13	20	15	6	6
<i>Pseudomonas</i> spp. 41	6	6	26	32	70	30	6	28													
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8	6	6	29	20	23	6	23	10	6	6	6	40	6	6	14	23	25	24	35	19	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 3	6	6	6	6	13	6	6	6	6	6	6	28	22	22	23	20	20	24	30	30	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 9	6	6	6	6	12	6	6	6	6	6	6	22	17	20	24	19	18	18	34	24	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 13	6	6	6	6	15	6	6	6	6	6	6	38	30	30	36	28	20	32	46	32	6

**Legenda:** antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: AUG - amoxicilina com ácido clavulânico; AML – ampicilina; CTX – cefotaxima; CAZ – ceftazidima; FEP – cefepime; ATM - aztreonam, FOX - ceftoxitina, IMP - imipenemo; ETP – Ertapenemo; DORI – Doripenemo; antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos: CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; AK – amicacina; TOB – tobramicina; FOS – Fosfomicina; TE - tetraciclina, TGC – tigeciclina; STX - Sulfametoxazol + Trimetoprim; F - nitrofurantoína; C – cloranfenicol; Avaliação qualitativa da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos segundo diretrizes do CLSI (2013): **Isolado resistente**; **Isolado com sensibilidade intermédia**; **Isolado sensível**;

A flora intestinal tem sido descrita nos últimos anos, como importante reservatório de bactérias multirresistentes aos antibióticos, com papel fundamental na disseminação de bactérias e de genes de resistência aos antibióticos a diferentes nichos, entre eles a água e a comunidade.

Como podemos ver pela tabela 18, foram identificadas diferentes tipos de bactérias pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. Comparando os resultados da suscetibilidade aos antibióticos obtidas pelas bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (tabela 18) com os resultados obtidos pelas bactérias não-*Enterobacteriaceae* (tabela 19), constata-se que as bactérias não-*Enterobacteriaceae* apresentam um perfil de resistência mais amplo que as bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

### **Família *Enterobacteriaceae***

Os coliformes são microrganismos indicadores de contaminação fecal, comumente utilizados para avaliação da qualidade da água. Encontram-se amplamente distribuídos na natureza por serem bastante comuns nas fezes humanas e de outros animais de sangue quente, todavia quando encontrados em águas para consumo humano podem despoletar problemas do ponto de vista da saúde pública.

Alguns Gêneros como *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, vivem na água, no solo e também fazem parte da flora intestinal do homem, assim como outros animais de sangue quente, contudo quando disseminados no meio aquático podem disseminar as resistências e vir a colonizar a flora intestinal humana, sendo um sério problema de saúde pública.

- ***E.coli***

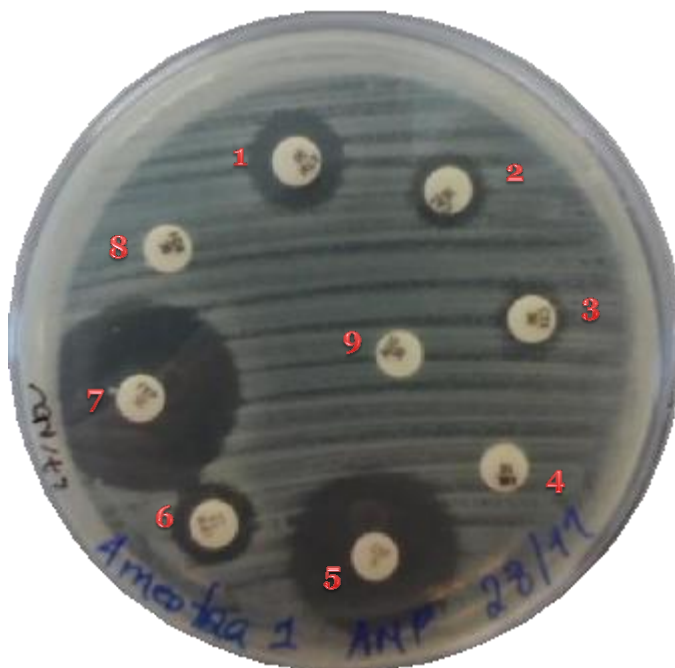
Os coliformes fecais, mais especificamente *E. coli*, fazem parte da microbiota intestinal do homem e outros animais de sangue quente. Estes microrganismos quando detetados numa amostra de água fornecem evidência direta de contaminação fecal recente, e por sua vez podem indicar a presença de microrganismos patogênicos.

A presença de microrganismos patogênicos na água geralmente é decorrente da poluição por fezes humanas e de animais, provenientes de águas residuárias urbanas e rurais.

Analisando os resultados obtidos na tabela 13 e 18, verifica-se que em pelo menos 4 amostras de água analisadas tinham a presença de *E.coli*, que do ponto de vista

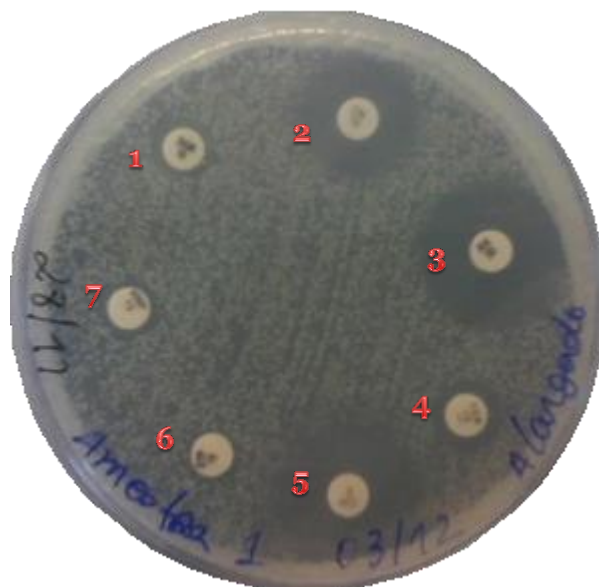
- *Klebsiella Pneumoniae*

Neste trabalho, verificou-se a presença de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente aos antibióticos, nomeadamente às cefalosporinas 2ª e 3ª geração, monobactams (ilustração 14) e carbapenems (ilustração 15), contudo não se verificou a presença de ESBLs e carbapenemases, mas sim de uma beta-lactamase do tipo AmpC plasmídica.



Página | 74





**Ilustração 15 - Antibiograma alargado do isolado *Klebsiella pneumoniae* 12**  
**Legenda:** 1- DOR; 2-CN; 3- AK; 4- TOB; 5- CIP; 6- ETP; 7- MRP;

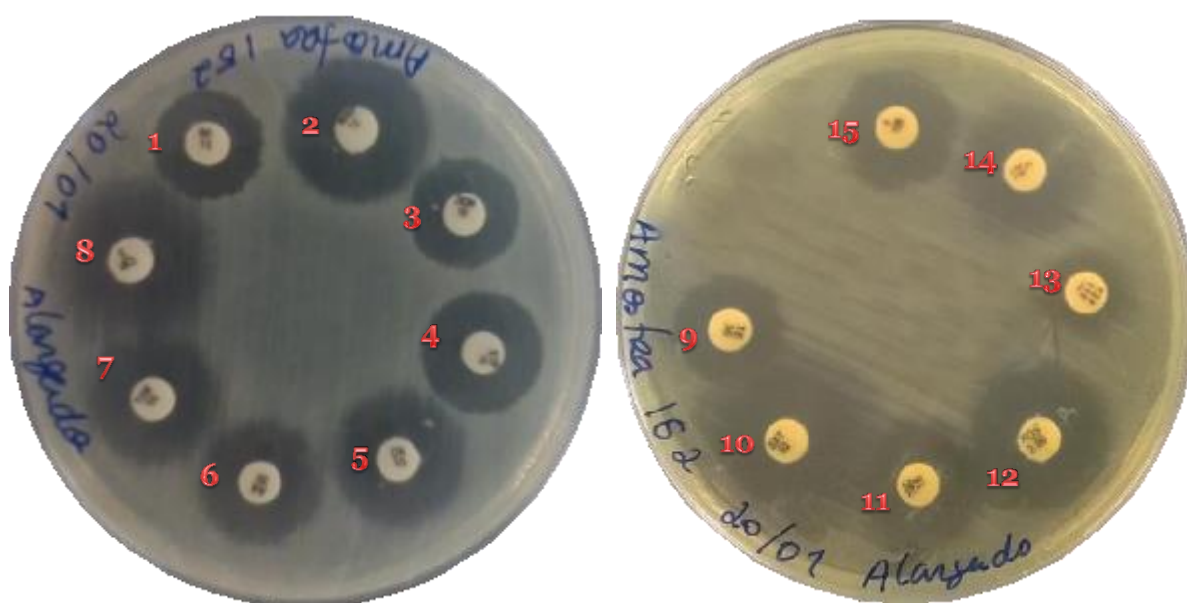
- ***Citrobacter freundii***

O *Citrobacter* pode ser encontrado nas fezes, pertence ao grupo dos coliformes, por isso são indicadores de contaminação fecal.

Neste estudo foram identificados vários isolados de *Citrobacter freundii*, tanto em águas de poço, fontanário e minas, mas o que mais se destacou em relação ao perfil de multirresistência antimicrobiana (ilustração 16 e 17), foi o encontrado numa mina. Este facto é relevante, uma vez que o *Citrobacter freundii* nativo não apresenta esta multirresistência, e a sua presença poderá ser evidência da cada vez maior disseminação de resistência aos antibióticos <sup>136</sup>.



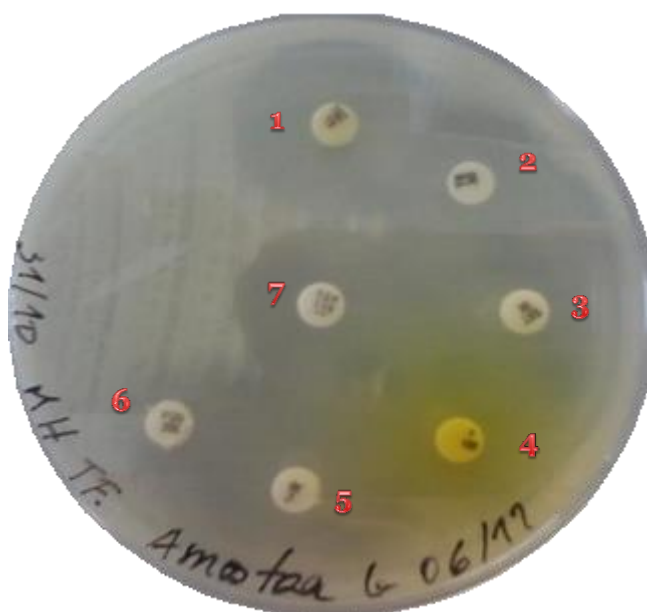
**Ilustração 16 - Antibiograma do isolado *Citrobacter freundii* 3**  
**Legenda:** 1-FOX; 2- CTX; 3- ATM; 4- AML; 5- ETP; 6- IMI; 7- FEP; 8- CAZ; 9 – AUG;



**Ilustração 17 – Antibiograma alargado do isolado *Citrobacter freundii* 3**  
**Legenda:** 1- IMI; 2- MRP; 3- DOR; 4- ETP; 5- CN; 6- AK; 7- TOB; 8- F; 9- TE; 10- SXT; 11- TGC; 12- FOS; 13- TZP; 14- C; 15 - F

- ***Enterobacter cloacae***

Neste estudo, foram encontradas três bactérias *Enterobacter cloacae* em três poços distintos. Em termos de resistência, apresentavam-se muito semelhantes, com exceção da amostra G, que apresentava resistência à fosfomicina (antibiótico tomado em regime ambulatorio para o tratamento de infecções do trato urinário) como se comprova pela ilustração 18. Esta evidência é muito importante, pois é sugestivo de possível contaminação fecal nestas águas, comprovando-se quando analisada a tabela 13, observando-se um elevado número de coliformes e não coliformes, superior a 300 UFC/100 ml <sup>137</sup>. Uma informação relevante é que este poço encontra-se perto de uma fossa e segundo informação do proprietário da casa, ocorreu um vazamento da fossa devido ao rebentamento de um tubo, o que pode justificar esta elevada carga microbiana (ilustração 19).



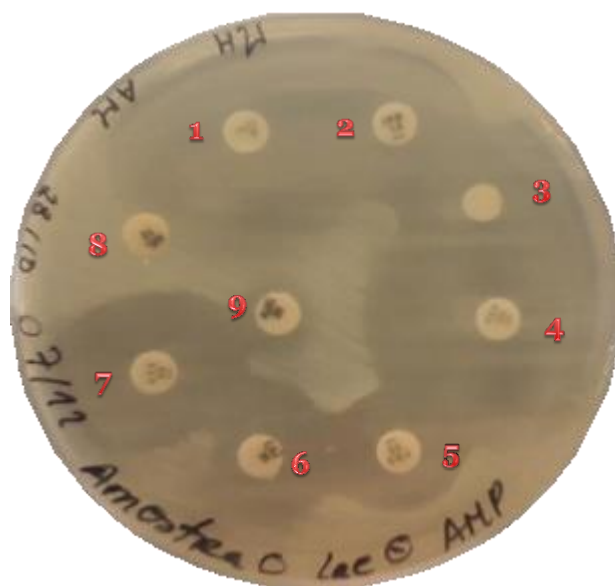
**Ilustração 18 - Antibiograma alargado do isolado *Enterobacter cloacae* 7**  
**Legenda:**1- TGC; 2- TE; 3- SXT; 4- F; 5- C; 6- FOS; 7- TZP;



**Ilustração 19 - Fotografia da localização de poço e fossa**  
**Legenda:** A- Fossa; B- Poço

- ***Shigella***

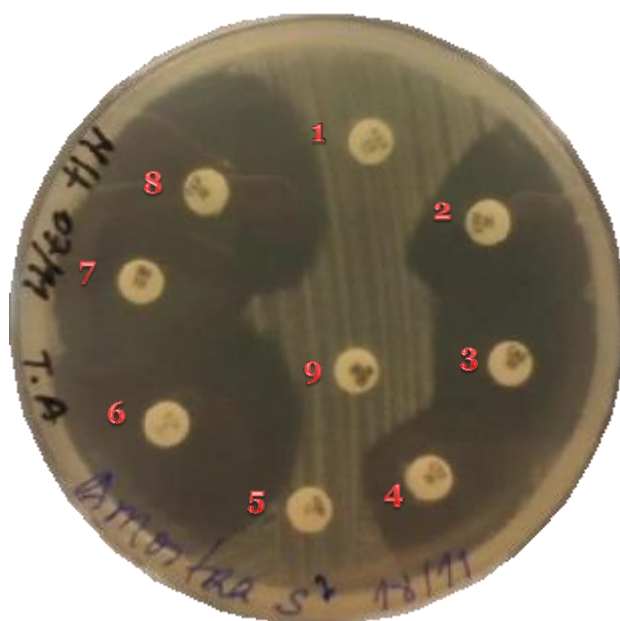
Uma das bactérias identificadas e mais importantes do ponto de vista da saúde pública, foi a *Shigella* num fontanário pois constitui um motivo de preocupação podendo despoletar um surto diarreico nas populações que se abastecem com esta água, porque a consomem sem qualquer restrição. Esta bactéria não apresenta elevada resistência antimicrobiana (ilustração 20), mas é um agente patogénico responsável pelo desencadeamento de surtos diarreicos <sup>138</sup>



**Ilustração 20 – Antibiograma do isolado *Shigella* 29**  
**Legenda:** 1- CIP; 2- IMI; 3- ATM; 4- FEP; 5- FOX; 6- CAZ; 7- CTX; 8- AML; 9- AUG;

- ***Cedecea***

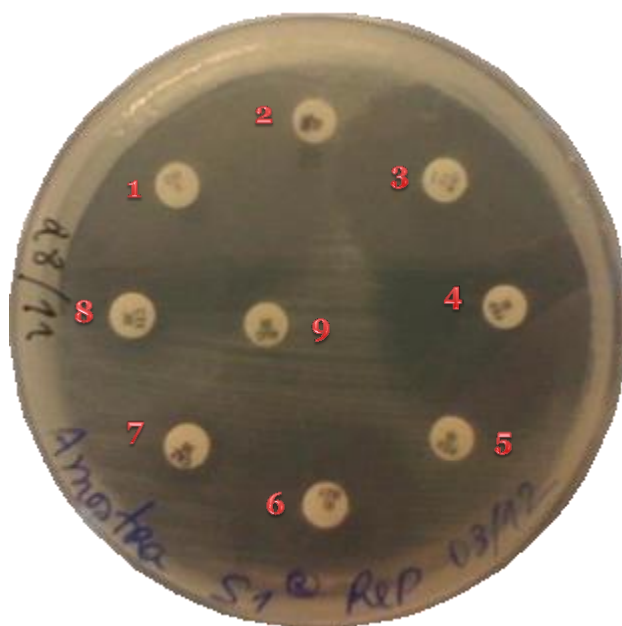
A presença de *Cedecea* como agente etiológico da infecção tem sido relatada em infecções do pulmão e pneumonias. Deve-se ter em consideração a sua presença visto que apresenta um perfil considerável de resistência a antibióticos, presença de antagonismo e bata-lactamase do tipo AmpC cromossômica, sendo que o tratamento deve ser realizado por combinação de antibióticos (ilustração 21) <sup>139, 140</sup>.



**Ilustração 21 – Antibiograma do isolado *Cedecea* 38**  
**Legenda:** 1- FOX; 2- ATM; 3- CAZ; 4- CTX; 5- AML; 6- CIP; 7- IMI; 8- FEP; 9- AUG;

- ***Pantoea***

Esta bactéria patogénica oportunista que apresentou multirresistência aos antibióticos, sobretudo às cefalosporinas de 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração e ao Aztreonam (ilustração 22). É habitualmente encontrada no solo, água e alimentos para animais, não existindo relatos de grande relevância relativamente a infeções adquiridas na comunidade. Contudo, em indivíduos hospitalizados pode causar epidemias quando associada ao uso de produtos contaminados por via intravenosa devido à sua capacidade a crescer em fluidos de infusão comerciais <sup>141</sup>.



**Ilustração 22 – Antibiograma do isolado *Pantoea* 38**  
**Legenda:**1- CIP; 2-AML; 3-IMI; 4- FEP; 5- FOX; 6- ATM; 7- CAZ; 8- CTX; 9- AUG;

As bactérias *Klebsiella rhinoschleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter rodentium* e *Proteus vulgaris* são importantes do ponto de vista microbiológico para a saúde humana pois podem despoletar infeções nos seres humanos, visto que a maioria são bactérias patogénicas e as restantes oportunistas, mas do ponto de vista das resistências aos antibióticos, não apresentaram grande relevância <sup>142</sup>.

## Não – *Enterobacteriaceae*

- *Stenotrophomonas maltophilia*

A identificação de *Stenotrophomonas maltophilia* presente na água para consumo humano é um achado importante e extremamente preocupante, pois esta bactéria apresenta multiresistência nativa a antibióticos <sup>59, 143, 144</sup>. Descrita sobretudo por causar infecções nosocomiais em indivíduos imunodeprimidos, atualmente já provoca infecções na comunidade sendo cada vez mais um preocupante problema de saúde pública <sup>71, 145</sup>.

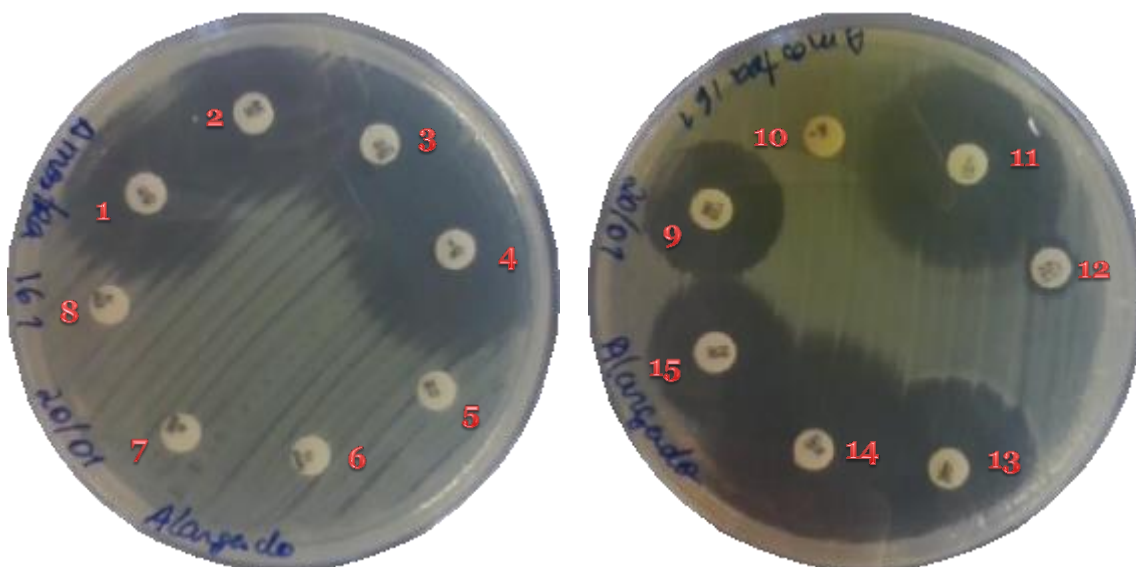
Bactéria caracterizada pela capacidade de colonização do trato respiratório e por ser multirresistente à maioria dos antibióticos devido a elevadas taxas de morbidade e mortalidade e preocupante no ambiente de prestação de cuidados de saúde <sup>71</sup> (ilustração 23 e 24).



**Ilustração 23 – Antibiograma do isolado *Stenotrophomonas maltophilia* 1**

**Legenda:** 1- FEP; 2- CAZ; 3- FOX; 4- CTX; 5- ATM; 6- AML; 7- ETP; 8- IMI; 9- AUG;



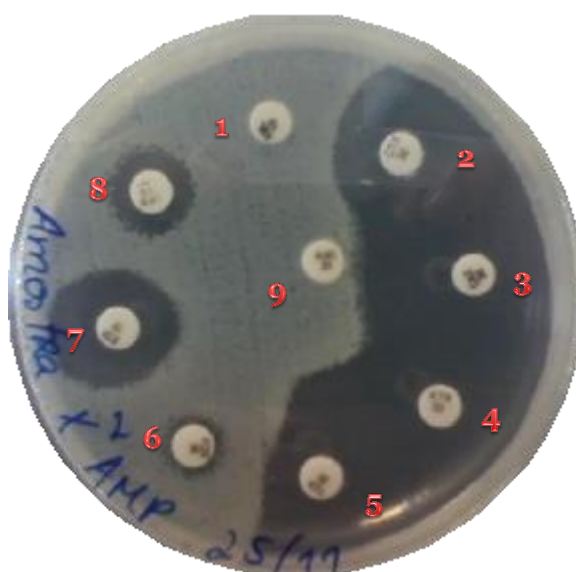


**Ilustração 24 – Antibiograma alargado do isolado *Stenotrophomonas maltophilia* 1**  
**Legenda:** 1-CN; 2- AK; 3- TOB; 4- CIP; 5- IMI; 6- MRP; 7- DOR; 8- ETP; 9- FOS; 10- F; 11- C; 12- TZP; 13- TGC; 14- SXT; 15- TE;

- ***Burkholderia cepacia***

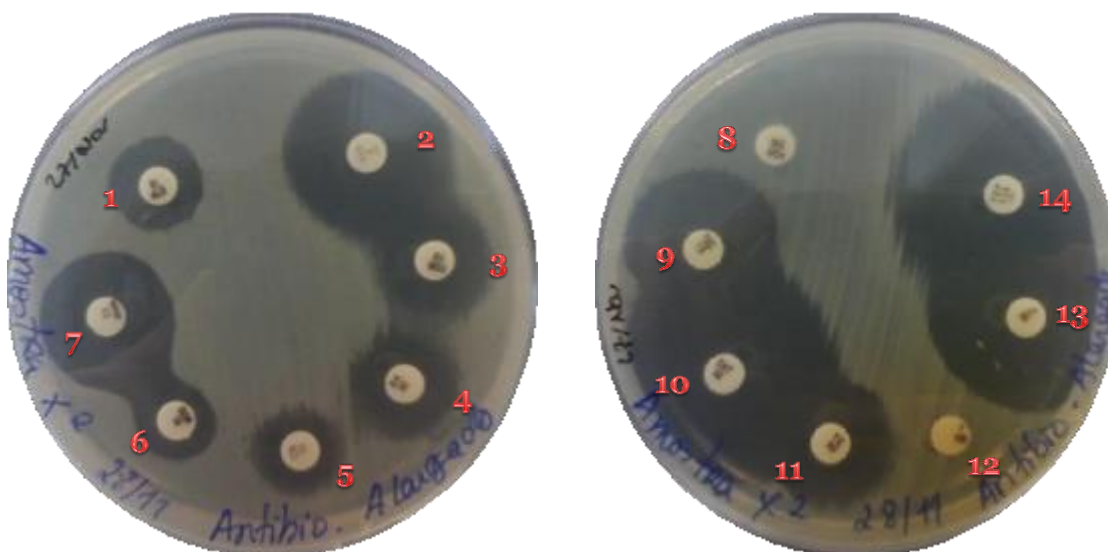
*Burkholderia cepacia* é uma das bactérias Gram-negativas mais resistentes encontradas nos hospitais, é caracterizada como sendo oportunista e muito comum a colonizar pacientes imunodeprimidos e com fibrose cística <sup>146, 147</sup>.

Apresenta resistência muito relevante aos antibióticos, sobretudo resistência à FOX, AUG, AML e aos carbapenemos (ilustração 25 e 26). Além disso, apresenta antagonismo, apresentando uma beta-lactamase do tipo AmpC cromossômica <sup>147</sup>.



**Ilustração 25 – Antibiograma do isolado *Burkholderia cepacia* 19**  
**Legenda:** 1- AML; 2- CTX; 3- CAZ; 4- ATM; 5- FEP; 6- FOX; 7- ETP; 8- IMI; 9- AUG;

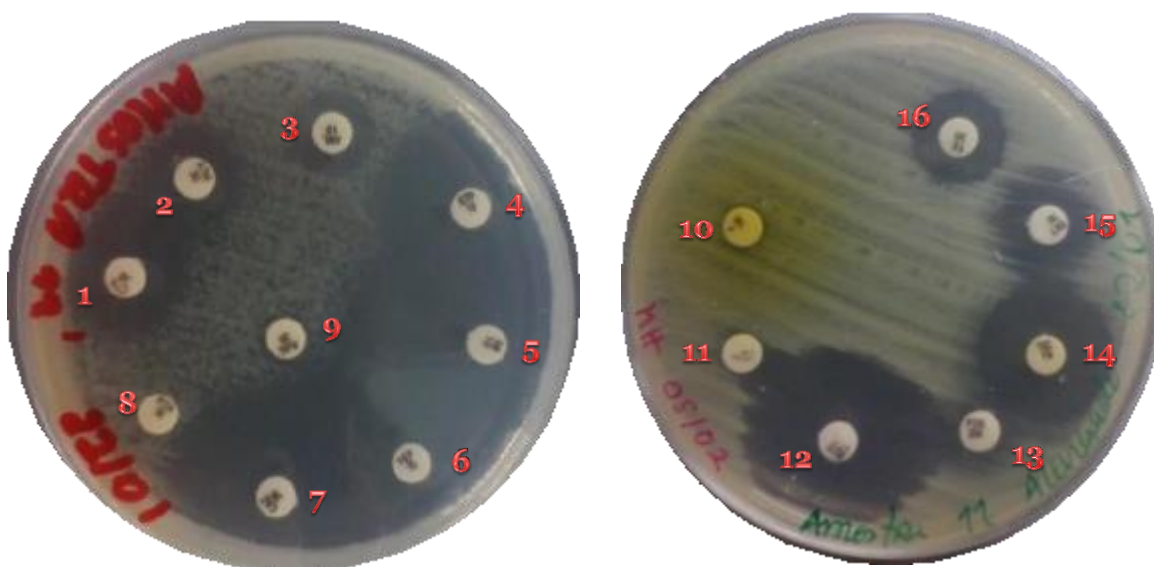




**Ilustração 26 – Antibiógrama alargado do isolado *Burkholderia cepacia* 19**  
**Legenda:** 1- ETP; 2- CIP; 3- TOB; 4- AK; 5- CN; 6- DOR; 7- MRP; 8- FOS; 9- TGC; 10- SXT; 11- TE; 12- F; 13- C; 14- TZP;

### • *Myroides*

*Myroides* é uma bactéria caracterizada por estar presente em fontes ambientais e ser oportunista, causa infecções sobretudo em indivíduos imunodeprimidos. Já foi identificada como colonizadora em endocardites, infecções do trato urinário e tecidos moles <sup>148</sup>. Apresenta um perfil de resistência amplo, devendo existir atenção especial para esta bactéria (ilustração 27). Entre as principais resistências, são de destacar a resistência ao CTX, ATM, FOX, AML, AUG, Cloranfenicol, Nitrofurantoína e fosfomicina.

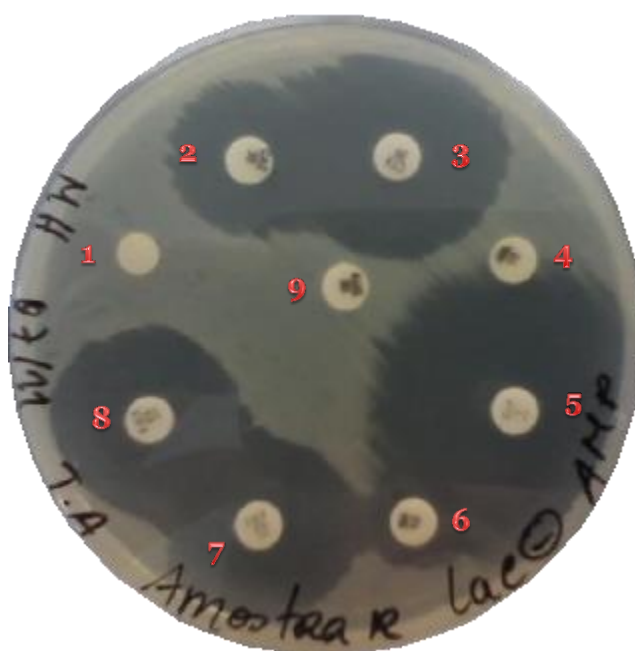


**Ilustração 27 - Antibiógrama do isolado *Myroides* 17**  
**Legenda:** 1- CTX; 2- ATM; 3- AML; 4- ETP; 5- IMI; 6- FEP; 7- CAZ; 8- FOX; 9-AUG; 10-F; 11-C; 12-TZP; 13- FOS; 14- TGC; 15- SXT; 16- TE;

- ***Pseudomonas* spp.**

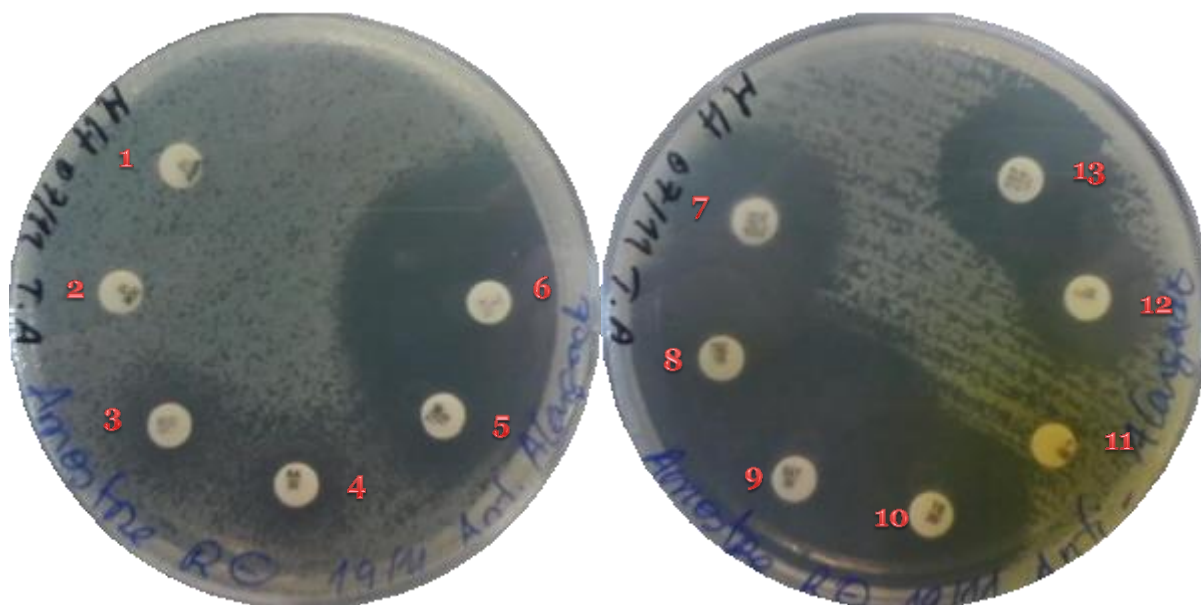
*Pseudomonas* spp. constitui a principal causa de duas infecções frequentes: a otite externa (infecção do canal auditivo externo devida a exposição prolongada à água doce) e a foliculite da banheira que é uma erupção cutânea formada por pequenas pústulas, algumas das quais podem conter uma gota de pus no centro. As infecções graves por *Pseudomonas* afetam sobretudo imunodeprimidos. As *Pseudomonas* podem infectar o sangue, a pele, os ossos, os ouvidos, os olhos, as vias urinárias, as válvulas cardíacas e os pulmões.

*Pseudomonas fluorescens* foi detetada numa água de poço, apresentando uma resistência aos antibióticos significativa, sobretudo a resistência aos B-lactâmicos, inclusive aos carbapenemos (ilustração 28). Esta resistência deverá ter sido adquirida, pois no seu estado nativo esta bactéria não apresenta este tipo de resistência, outra forte evidência da cada vez mais rápida disseminação da resistência aos antibióticos <sup>149</sup> (ilustração 29).



**Ilustração 28 - Antibiograma do isolado *Pseudomonas fluorescences* 8**

**Legenda:** 1- ATM; 2- CAZ; 3- CTX; 4- AML; 5- CIP; 6- IMI; 7- FEP; 8- FOX; 9- AUG;



**Ilustração 29 - Antibiograma alargado do isolado *Pseudomonas fluorescens* 8**  
**Legenda:** 1- MRP; 2-DOR; 3- CN; 4- AK; 5- TOB; 6-CIP; 7- FOS; 8- TGC; 9- SXT; 10- TE; 11- F; 12- C; 13- TZP;

#### 4. Detecção de ESBLs pelo teste fenotípico

Detecção de ESBLs através do teste fenotípico do disco combinado. Na tabela 20 estão apresentados os resultados efetuados através desta técnica.

**Tabela 20 - Teste fenotípico do disco combinado**

Isolado	Teste do disco combinado (mm)						ESBL
	CTX	CTX + Ácido clavulânico	CAZ	CAZ + Ácido clavulânico	ATM	ATM + Ácido clavulânico	
<i>E. coli</i> 39	40	40	----	----	----	----	Não visualizada
<i>Enterobacter cloacae</i> 7	14	16	----	----	----	----	Não visualizada
<i>Enterobacter cloacae</i> 25	8	8	----	----	----	----	Não visualizada
<i>Enterobacter cloacae</i> 27	13	15	----	----	----	----	Não visualizada
<i>Shigella</i> 29	22	22	23	23	----	----	Não visualizada
<i>E. coli</i> 30	25	25	----	----	----	----	Não visualizada
<i>Myroides</i> 17	12	17	----	----	----	----	Possível
<i>Citrobacter freundii</i> 32	10	10	6	12	----	----	Possível
<i>Morganella morganii</i> 3	16	16	20	20	----	----	Não visualizada
<i>Citrobacter freundii</i> 3	12	12	6	13	----	----	Possível

#### 4.1. Pesquisa de ESBLs por métodos moleculares

Após análise dos resultados através da detecção das  $\beta$ -lactamases pelo teste fenotípico (tabela 20), procedeu-se à pesquisa através de métodos moleculares dos resultados que tinham sido considerados positivos.

Através da realização de métodos moleculares pode-se concluir o tipo de beta-lactamase presente.

Foi realizada a caracterização por PCR dos genes das principais famílias das ESBLs, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> grupo 1,2,3,8,9 e 25 em todos os isolados presentes na água de consumo humano não tratada que apresentaram fenótipo de produção de ESBL detetado na avaliação fenotípica.

A produção de  $\beta$ -lactamases é o resultado de um processo evolutivo e da pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos. Foram analisados, através da PCR, 3 isolados possivelmente produtores de ESBLs, detetados através de testes fenotípicos. Os testes fenotípicos confirmatórios são rotineiramente utilizados para detecção de ESBLs, principalmente em *E. coli* e *Klebsiella* spp., mas com o aumento da ocorrência de ESBLs noutras enterobactérias, é necessário também avaliar a ocorrência em espécies que não-*E. coli* e não-*Klebsiella* sp. No presente estudo, a produção de ESBLs não foi verificada.

As ESBLs do tipo TEM são frequentemente encontradas em bactérias Gram-negativas, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, todavia neste estudo isso não se verificou, pois na realização dos testes fenotípicos estes géneros de bactérias não apresentaram evidências da presença de ESBLs <sup>150,151</sup>.

A detecção de um maior número de isolados que albergam os genes de beta-lactamases em relação aos testes fenotípicos ressalta a importância do uso de métodos moleculares no esclarecimento dos aspetos epidemiológicos das bactérias resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Dessa forma, uma identificação precisa de bactérias produtoras de ESBLs é importante não somente para a escolha da terapêutica, mas também para a aplicação de medidas de controlo que visem reduzir ou impedir a sua disseminação <sup>152</sup>

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, inexistência de isolados presentes nas águas de consumo humano produtores de ESBL, é importante chamar a atenção para a necessidade de existir mais estudos que visem a caracterização molecular para elucidar a disseminação desse mecanismo de resistência na comunidade e verificar se os testes fenotípicos de detecção de ESBLs são os mais indicados para bactérias de origem ambiental.

## 5. Detecção de Carbapenemases pelo método CIM e Teste de combinação em disco de Meropenemo com inibidores de carbapenemases

No quadro 4 estão apresentados os resultados dos testes fenotípicos realizados para a detecção da presença de carbapenemases. Os isolados foram selecionados com base na sua resistência aos carbapenemos.

**Quadro 4 - Resultados dos Teste com EDTA e CIM para pesquisa de Carbapenemases**

Isolado	Teste com EDTA	Teste CIM
<i>Burkholderia cepacia</i> 19	Não visualizada	Não visualizada
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12	Não visualizada	Não visualizada
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8	Possível	Não visualizada
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1	Possível	Possível
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 9	Possível	Não visualizada
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 13	Possível	Não visualizada

### 5.1. Pesquisa de Carbapenemases por métodos moleculares

Foi realizada PCR para pesquisa de carbapenemases mais prevalentes para todos os isolados que apresentaram resistência aos carbapenemos, IMP, VIM e KPC.

As carbapenemases são usualmente capazes de hidrolisar os carbapenemos, mas também os  $\beta$ -lactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas.

Atualmente são encontradas três grandes classes de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*: as M $\beta$ LS, tipo IMP, VIM e NDM são as mais frequentemente detectadas.

A carbapenemases do tipo OXA mais frequente em enterobactérias é a OXA-48; e as carbapenemases do tipo KPC. Do ponto de vista epidemiológico são de extrema relevância as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais <sup>127, 153</sup>.

Contudo, na realização da PCR para a pesquisa de carbapenemases não foram detetadas carbapenemases, apesar de ser expectável que aparecessem conforme a literatura e os resultados dos testes fenotípicos realizados segundo o método com EDTA e CIM. Como não estão presentes as carbapenemases, a resistência aos carbapenemos por parte destes isolados pode ser explicada por outro mecanismo de resistência como por exemplo: alteração de porinas e/ou bombas de efluxo ou impermeabilidade da membrana.

É de referir que podemos validar os resultados desta PCR, porque os controlos positivo e negativo foram corretamente apresentados.

## 6. Detecção de AmpC pelo teste fenotípico

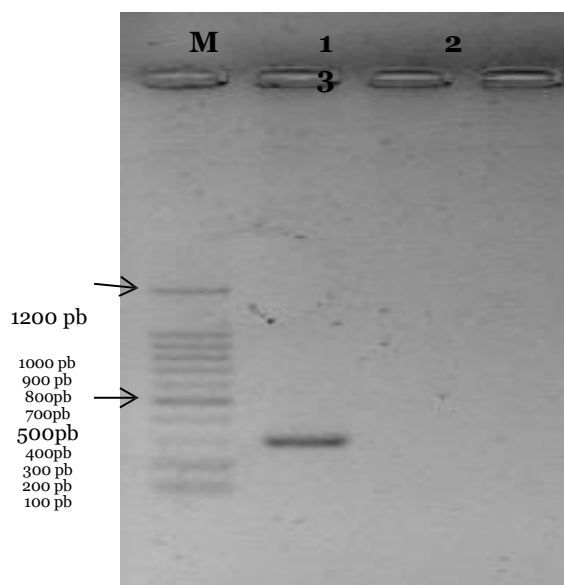
Detecção AmpC através do teste de disco de antimicrobianos combinados com inibidores enzimáticos específicos para cada enzima, neste caso com Cloxacilina. Os resultados estão apresentados no quadro 5.

**Quadro 5 - Resultados da detecção da AmpC pelo teste fenotípico com Cloxacilina**

Isolado	Resistência à cefoxitina	Antagonismo	Interpretação
<i>Burkholderia cepacia</i> 19	Sim	Sim	AmpC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12	Sim	Não	AmpC
<i>Stenotrophomas maltophilia</i> 1	Sim	Não	Sem AmpC
<i>Stenotrophomas maltophilia</i> 9	Sim	Não	Sem AmpC
<i>Stenotrophomas maltophilia</i> 13	Sim	Não	Sem AmpC

### 6.1. Pesquisa de AmpC por métodos moleculares

A pesquisa de AmpC através de PCR foi realizada no isolado *Klebsiella pneumoniae* 12 porque esta não possui intrinsecamente a presença de AmpC, podendo ter adquirido esta beta-lactamase através de conjugação <sup>106</sup>. A suspeita da presença de uma beta-lactamase do tipo AmpC deveu-se à resistência à cefoxitina apresentada por este isolado. Por isso, pesquisou-se a presença de genes codificadores de AmpC (*AmpC*; *CMY*; *DHA-1*; *DHA-2*; *Regulador de DHA*; *ACC*; *MIR-1T*; *ACT-1*; *LAT-1 a LAT-4*; *CMY-2 a CMY-7*; *BIL-1*) no isolado *Klebsiella pneumoniae* 12.



**Ilustração 30 - Detecção do gene codificador de AmpC**

**Legenda:** M= marcador de peso molecular (pb); 1= *Klebsiella pneumoniae* 12; 2= Controlo negativo; 3= Branco (Controlo da reação)

A investigação da presença de genes determinantes da produção de AmpC plasmídica (pAmpC), através de PCR identificou o gene MIR-1T e ACT-1 presente no isolado *Klebsiella pneumoniae* 12, apresentando uma banda com o peso molecular de 302 pb (ilustração 30).

Se não fosse amplificado nenhum destes genes, mais comumente descritos na literatura, seria de considerar que a resistência a cefoxitina nestes isolados pudesse ser consequência de outros mecanismos, como alteração do perfil de porinas <sup>106</sup>.

Em *K. pneumoniae* são encontradas apenas enzimas AmpC plasmídicas (pAmpC) <sup>154-157</sup>. A maioria das estirpes produtoras também produzem ESBLs do tipo TEM, SHV e CTX-M, e a diversidade de  $\beta$ -lactamases expressas, bem como a ausência de recomendações internacionais para a detecção de produtores de pAmpC dificultam a sua detecção fenotípica <sup>90, 155</sup>. Em muitos casos, estas estirpes são identificadas apenas como produtoras de ESBL, o que pode levar a falha terapêutica, pois o espectro de resistência apresentado por produtores de pAmpC é mais amplo. Estas enzimas são consideradas, ao lado da produção de CTX-M, como um importante determinante para resistência a antibióticos beta-lactâmicos em *K. pneumoniae* <sup>158</sup>.

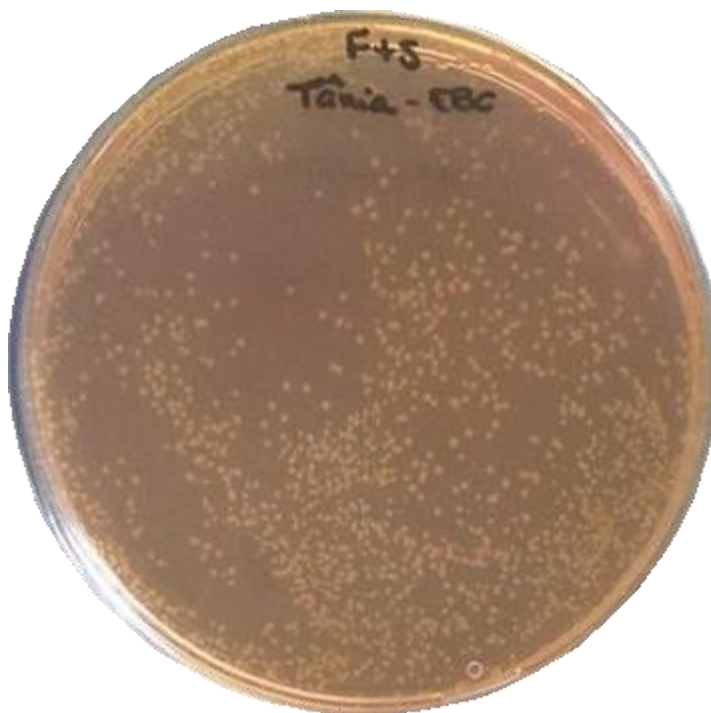
## 6.2. Conjugação

As células bacterianas além do DNA cromossômico, podem conter pequenas moléculas circulares de DNA denominadas plasmídeos R com genes responsáveis pela síntese de enzimas que neutralizam um antibiótico antes que ele destrua a bactéria. Além disso, os plasmídeos R possuem genes que permitem a passagem de uma bactéria para outra. Quando dois ou mais tipos de plasmídeos R estão presentes em uma mesma bactéria, os genes de um deles pode passar para outro por recombinação gênica: conjugação, transformação e transdução. Esse mecanismo faz com que surjam plasmídeos R portadores de diversos genes para resistência a diferentes antibióticos <sup>8</sup>.

Os plasmídeos podem estar integrados no cromossoma, sendo capazes de transferir genes cromossômicos. Muitos são promíscuos, isto é, passam o gene de resistência para espécies não aparentadas geneticamente <sup>8</sup>.

Foi realizada a técnica de conjugação para verificar se a aquisição de beta-lactamase do tipo AmpC que o isolado *Klebsiella pneumoniae* 12 se deveu a conjugação.

Como se pode observar pela ilustração 31, existiu crescimento de transconjugantes, isto porque as colônias se apresentavam como sendo não fermentadoras da lactose e resistentes à streptomina (característica da bactéria receptora) e adquiriram resistência à cefoxitina (característica da bactéria dadora).

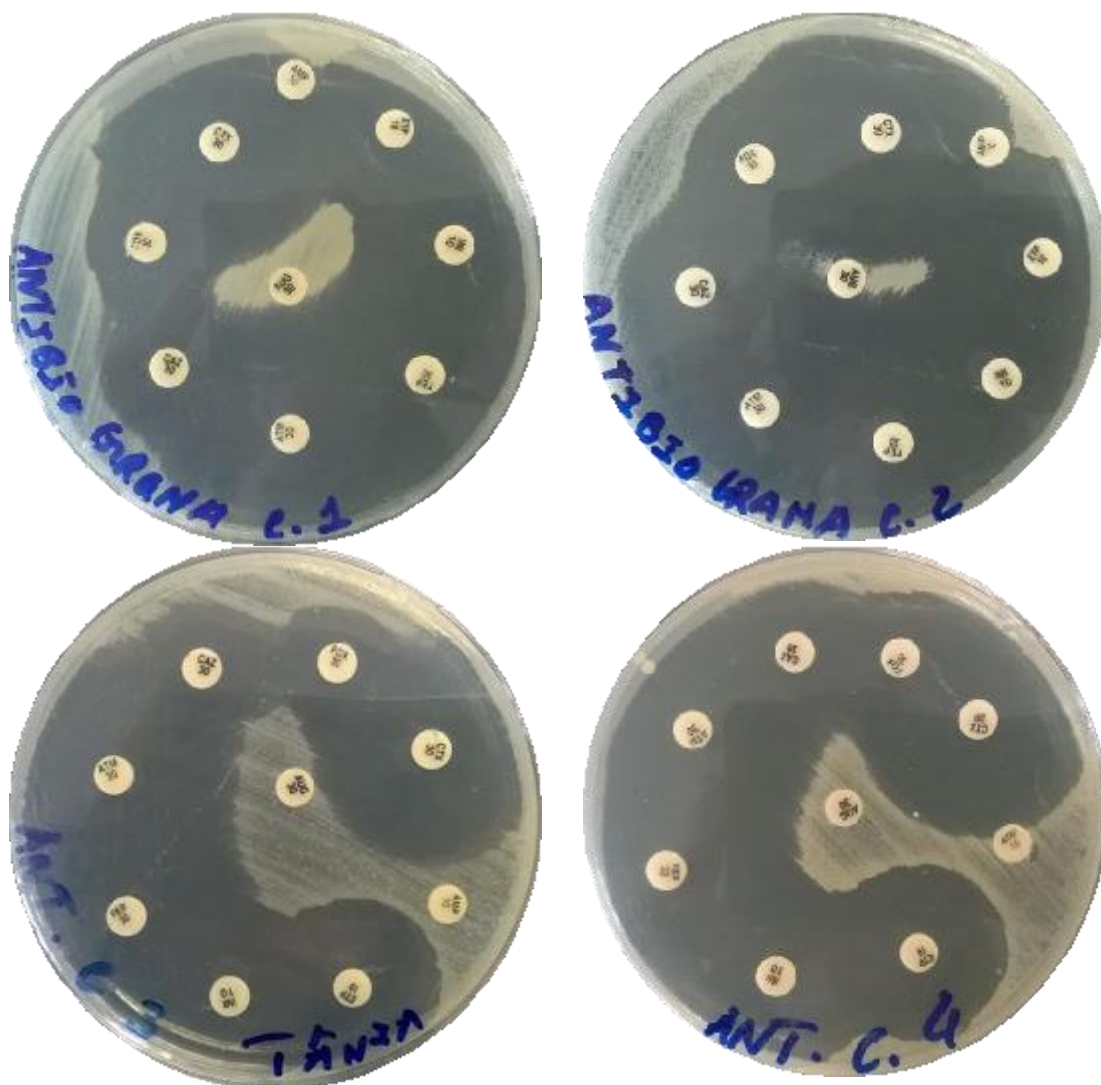


**Ilustração 31 - Colônias não fermentadoras da lactose e resistentes à streptomicina e Cefoxitina**

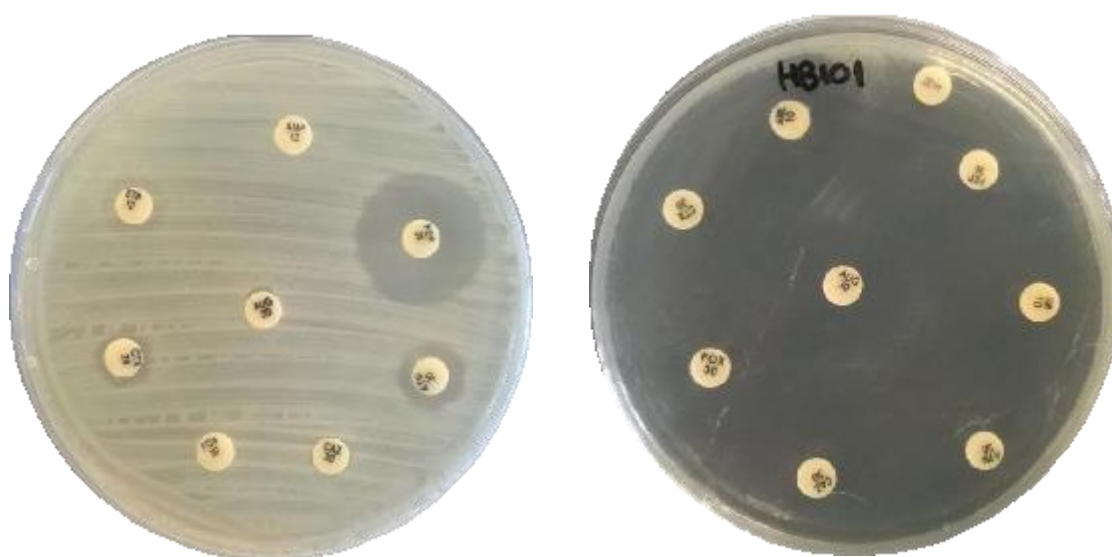
Para a confirmação da presença de transconjugantes, repicaram-se algumas colônias deste meio seletivo para outro meio seletivo com streptomicina e cefoxitina, na tentativa de isolar os transconjugantes e poder continuar com os testes confirmatórios. Após isolamento, realizaram-se antibiogramas para verificar se estas bactérias apresentavam o mesmo fenótipo que as bactérias dadoras, ou seja, resistência à AML, CTX, ATM, CAZ e FOX. Como se pode verificar pela ilustração 32 e comparando com as ilustrações 33 e 34, o fenótipo não se verifica, logo não estamos na presença de transconjugantes. Esta verificação é realizada quando se comparam os antibiogramas dos transconjugantes com os antibiogramas da bactéria dadora (ilustração 33) e bactéria receptora (ilustração 34).

É de salientar que durante a execução de toda a técnica, foram realizados todos os controlos de qualidade a fim de se assegurar a fiabilidade e veracidade dos resultados.





**Ilustração 32 - Antibiogramas dos Transconjugantes**



**Ilustração 33 - Antibiograma do isolado *Klebsiella pneumoniae* 12 (dadora)**

**Ilustração 34 - Antibiograma *E. coli* HB101 (receptora)**

## IV. Conclusões

Um dos objetivos operacionais do Plano Estratégico de Abastecimento de Água e de Saneamento de Águas Residuais PEAASAR II (2007-2013) é servir cerca de 95% da população do país, com sistemas públicos de abastecimento de água. Transpondo esse objetivo para o distrito do Porto, sobretudo nos concelhos de Paredes e Lousada, verifica-se que existe ainda muitas populações que não possuem saneamento e água tratada.

As 42 amostras de água não tratada para consumo humano utilizadas neste trabalho são provenientes de fontes, poços e minas, estas águas não são distribuídas pelas entidades gestoras responsáveis por essa distribuição, logo não existe obrigatoriedade da realização de análise segundo o Decreto-Lei n.º 306/07, 27 de Agosto. Desta forma o risco de transmissão de bactérias patogénicas ou comensais é elevado e de responsabilidade dos utilizadores.

Foram isoladas bactérias Gram-negativas não fermentadoras da lactose resistentes aos antibióticos que não são consideradas como indicadores da qualidade da água, mas que podem ser relevantes em termos de segurança da água, devido à criação de reservatórios de genes de resistência bacteriana aos antibióticos capazes de colonização intestinal da população que usa estas fontes de água não tratada.

Foram obtidos três isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, um isolado numa mina em Braga e os outros dois isolados em dois poços em Lousada.

A mina de Braga apresentava o UFC/100 ml de coliformes, ou seja, segundo o Decreto-Lei 306/2007 de 27 de Agosto, encontra-se própria para consumo, contudo foi isolado *Stenotrophomonas maltophilia*, uma bactéria multirresistente e cada vez mais emergente do ponto de vista de admissão em cuidados de saúde. Além do isolado *Stenotrophomonas maltophilia*, os poços apresentavam >300 UFC/100 ml de coliformes e não coliformes, ou seja, apresentavam elevada carga microbiana.

O aparecimento de *Stenotrophomonas maltophilia* em águas para consumo humano demonstra uma realidade desconhecida até à data e cujo impacto é desconhecido em termos de colonização intestinal da população e do risco que pode representar em termos de instalação de surtos de infeções em unidades de prestação de cuidados de saúde aquando admissão hospitalar desta população.

Foi isolado *Enterobacter cloacae* 7 resistente à fosfomicina num poço em Lousada, que apresentava >300UFC/100 ml de coliformes e não coliformes. Uma informação relevante é que este poço encontra-se perto de uma fossa e segundo informação do proprietário da casa, ocorreu um vazamento da fossa devido ao rebentamento de um tubo, o que pode justificar esta elevada carga microbiana.

Em Lousada, num poço, foi isolado *Pseudomonas fluorescens* 8 que apresentava resistência adquirida aos carbapenemos. Em termos microbiológicos, o poço apresentava elevada carga microbiana, >300UFC/100ml de não coliformes e 45 UFC/100 ml de coliformes. A proprietária desta casa informou que um familiar adoeceu ao consumir esta água, e com os isolados detetados é preocupante. Foi realizada PCR para deteção de carbapenemases, mas o resultado foi negativo, ou seja, provavelmente a resistência aos carbapenemos pode ser explicada por outros mecanismos de resistência aos carbapenemos.

*Klebsiella pneumoniae* 12 foi isolado de um poço em Lousada que apresentava 3 UFC/100 ml de coliformes e 0 UFC/100 ml de não coliformes. Este isolado apresentava elevada resistência aos antibióticos, sobressaindo a resistência aos carbapenemos e à cefoxitina. Foi realizada PCR para pesquisa de carbapenemases, tendo-se obtido resultado negativo. Por isso, foi realizada a pesquisa de beta-lactamase do tipo AmpC, devido à resistência que tinha à cefoxitina não ser intrínseca, mas resultado da conjugação foi negativo. A resistência pode ser devido à diminuição da permeabilidade da membrana externa aos Beta-lactâmicos.

Entre os resultados mais relevantes do ponto de vista de saúde pública, a presença da bactéria patogénica *Shigella* num fontanário em Paredes que apresentou 33UFC/100 ml de coliformes e 5 UFC/100 ml de não coliformes. A sua presença pode despoletar surtos diarreicos e demonstra contaminação fecal nesta água.

Foram isoladas 4 *E.coli* de dois fontanários (Valongo e Paredes), poços e minas (Vizela). Todos apresentavam elevadas carga microbianas, sobretudo o fontanário de Valongo, e o poço e mina de Vizela, pois apresentavam >300 UFC/100 ml de não coliformes, sugestivo de contaminação ambiental.

*Burkholderia cepacia* 19, isolado encontrado num poço em Paços de Ferreira que apresentava 0 UFC/100 ml de coliformes e 2 UFC/100 ml de não coliformes. Apesar de, segundo o *Decreto-Lei* 306/2007 de 27 de Agosto, esta água se encontrar própria para consumo, a presença deste isolado é importante devido à resistência apresentada e sendo relevante principalmente em unidades de cuidados de saúde.

A realidade sociológica das zonas, onde as águas foram colhidas, demonstra uma população idosa e cujo risco de necessidade de cuidados de saúde pode constituir um reservatório relevante deste tipo de colonizadores intestinais resistentes aos antibióticos como um ponto de entrada na prestação de cuidados de saúde, demonstrando a sua relevância em termos de saúde pública.

Na atualidade existe uma zona na área Metropolitana do Porto que não apresenta saneamento básico nem distribuição de água às residências. Esta realidade tem impacto

direto nas populações que usam a água de poços privados como única origem de água na residência.

Apesar de não terem sido isoladas bactérias produtoras de ESBLs é de extrema importância realizar os testes fenotípicos para verificar a sua presença pois a sua detecção é extremamente importante na escolha da terapêutica mais adequada nas infecções por estes isolados.

Os resultados sugerem uma complexa combinação de fenómenos genéticos e ecológicos nas bactérias presentes nas águas, envolvendo a introdução de estirpes resistentes e a disseminação horizontal de marcadores de resistência entre diferentes estirpes.

## **V. Perspetivas futuras**

Deve se reunir esforços para que as pessoas que somente têm acesso a água não tratada, proveniente de poços, fontanários ou minas, possam usufruir de água segura. Para tal, é necessário estabelecer medidas preventivas e análises obrigatórias para assegurar as condições satisfatórias a estas populações, apesar da responsabilidade ser dos proprietários.

Este estudo deveria ser realizado com um maior número de amostras para poder ser representativo de várias zonas do Norte do país, para verificar quais as regiões mais problemáticas do ponto de vista de contaminação microbiológica e de resistências em águas não tratadas para consumo humano. Podendo ainda posteriormente, ser realizada uma comparação dos resultados obtidos nas águas não tratadas com um estudo similar mas analisando águas residuais, para verificar se a disseminação das resistências é similar.

Outro estudo possível seria estudar a colonização intestinal da população que consome esta água.

É ainda essencial que o laboratório de microbiologia clínica se encontre preparado para a deteção destes mecanismos de resistência que têm surgido principalmente em surtos nosocomiais, mas cada vez mais em infeções adquiridas na comunidade.

## VI. Referências

1. Aryal J, Gautam B, Sapkota N. Drinking water quality assessment. Journal of Nepal Health Research Council. 2012; 10:192-6.
2. Lucas P, Cabral C, Colford J. Dissemination of drinking water contamination data to consumers: a systematic review of impact on consumer behaviors. PloS one. 2011; 6:e21098.
3. Andersson Y, Bohan P. Disease surveillance and waterborne outbreaks. World Health Organization. 2001.
4. Reynolds K. Newly Released Review on Drinking Water Outbreak Causes. Water Conditioning & Purification. 2013.
5. Rompre A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of Microbiological Methods. 2002; 49: 31–54.
6. Abo-Amer AE, Soltan el SM, Abu-Gharbia MA. Molecular approach and bacterial quality of drinking water of urban and rural communities in Egypt. Acta microbiologica et immunologica Hungarica. 2008; 55:311-26.
7. Cabral J. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2010; 7:3657-703.
8. Sasirekha B, Shivakumar S. Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. Indian Journal of Microbiology. 2012;52(2):174-179.
9. Schroder H, Tambosi J, Sena R, Moreira R, José H, Pinnekamp J. The removal and degradation of pharmaceutical compounds during membrane bioreactor treatment. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research. 2012; 65:833-9.
10. Halawani E. B-lactam antibiotic resistance in *Escherichia coli* commensal faecal flora of healthy population in Taif, Saudi Arabia. Academic Journals. 2011; 5:73-8.
11. Mohanta T, Goel S. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. Environmental monitoring and assessment. 2014; 186:5089-100.
12. Zhang Y, Zhang Y, Marrs C, Ye W, Simon C, Foxman B, et al. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. Applied and environmental microbiology. 2009; 75:5714-8.
13. Pathak S, Gopal K. Prevalence of Bacterial Contamination with Antibiotic Resistant and Enterotoxigenic Fecal Coliforms in Treated Drinking Water. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2013; 71:427-33.
14. Hong P, Al-Jassim N, Ansari M, Mackie R. Environmental and Public Health Implications of Water Reuse: Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes. Antibiotics. 2013; 2:367-99.
15. Sidrach-Cardona R, Hijosa-Valsero M, Martí E3 B, JL, Becares E. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. Science of the Total Environment 2014;220-7.
16. Ministério da Saúde. Manual de Inspeção Sanitária em Abastecimento de Água. 1ª edição. Brasil; 2006.
17. Fatombi K, Ahoyo T, Nonfodji O, Aminou T. Physico-Chemical and Bacterial Characteristics of Groundwater and Surface Water Quality in the Lagbe Town: Treatment Essays with Moringa oleifera Seeds. Journal of Water Resource and Protection. 2012; 4:1001-8.
18. Robson R, White R, Ness K. Transport coefficients for electrons in water vapor: definition, measurement, and calculation. The Journal of chemical physics. 2011; 134.
19. Silva A, Angelis C, Machado L, Waichaman A. Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus Simposio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. 2008:3577-84.
20. Hoekstra A, Chapagain A. Water footprints of nations: Water use by people as a function of their consumption pattern. Water Resources Management. 2006; 21:35-48.
21. Kolawole O, Ajayi K, Olayemi A, Okoh A. Assessment of water quality in Asa River (Nigeria) and its indigenous Clarias gariepinus fish. Int J Environ Res Public Health. 2011; 8:4332-52.
22. Diário da República. Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Portugal: Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional; 2007.
23. World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-water Quality. WHO Library Cataloguing. 2011.

24. Mekki A, Dhouib A, Sayadi S. Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research*. 2006; 161:93–101.
25. Aulicino F, Marranzano M, Mauro L. La contaminazione delle acque superficiali e gli indicatori microbiologici. *Ann Ist Super Sanità*. 2005; 41:359-70.
26. Tobon-Marulanda F, López-Giraldo L, Paniagua-Suárez R. [Water pollution caused by pesticides in an area of Antioquia]. *Revista de salud publica*. 2010; 12:300-7.
27. Araújo C. Contribuição para o Estudo da Viabilidade/Sustentabilidade da Dessalinização enquanto Técnica de Tratamento de Água. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa; 2013.
28. Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). Coping with water scarcity - an action framework for agriculture and food security. Roma, Itália: Food and agriculture organization of the United Nations; 2012.
29. Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Yokohama, Japan; 2014.
30. Quevauviller F, Thompson K. Analytical Methods for Drinking Water: Advances in sampling and analyses. England 2006.
31. Instituto Português de Acreditação (IPAC). Guia para aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 IPAC. Portugal; 2010.
32. Tyagi V, Chopra K, Kazmi A, Kumar A. Alternative Microbial Indicators of Faecal Pollution: Current Perspective *Environ Health Sci Eng*. 2006; 3:205-16.
33. Robles E, Ramirez E, Gonzalez M, Martinez M. Microbiological and Physicochemical Quality of Well Water Used as a Source of Public Supply. *Air, Soil and Water Research*. 2010; 3:105–12.
34. Mendes B, Oliveira JF. Qualidade da água para consumo humano. Lidel; 2004.
35. Gonçalves A. Avaliação da Reutilização de Água Residual Tratada para Consumo Humano por Processos de Separação por Membranas. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia; 2011.
36. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association; 2005.
37. World Health Organization (WHO)/ The United Nations Children's Fund (UNICEF). Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation Water Sanitation Health; 2014.
38. Afonso A, Lança I. Manual de Técnicas de Saneamento e Tratamento de Resíduos Sólidos Urbanos. Instituto Nacional de Administração. 2005.
39. Gajurel D, Benn O, Li Z, Behrendt J, Otterpohl R. Pre-treatment of domestic wastewater with pre-composting tanks: evaluation of existing systems. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 2003; 48:133-8.
40. Brown R. Soils and Septic Systems. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. 2006.
41. Vogel M. Septic Tank and Drainfield Operation and Maintenance. Montana State University - Extension Service. 2005.
42. Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, et al. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *The new microbiologica*. 2011; 34:17-24.
43. Craun G. The importance of waterborne disease outbreak surveillance in the United States. *Ann Ist super sanità*. 2012; 48:447-59.
44. Martinelli D, Prato R, Chironna M, Sallustio A, Caputi G, Conversano M, et al. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May - October 2006. *Eurosurveillance*. 2007; 12.
45. Semenza J, Nichols G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Eurosurveillance*. 2007; 12.
46. Coetsee N, Hawker J, Ibbotson S, Harrison T, Phin N, Laza-Stanca V, et al. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom. *Eurosurveillance*. 2012; 17.
47. Blake P, Rosenberg M, Florencia J, Costa J, Quintini J, Gangarosa E. Cholera in Portugal. "Transmission by Bottled Water," *American J Epidemiology*. 1977; 344-48:344-48.
48. Vestergaard L, Olsen K, Stersvold R, Bottiger B, Adelhardt M, Lisby M, Molbak k. Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused by contaminated drinking water in Denmark, January 2007. *Eurosurveillance*. 2007; 12.
49. Rizzo C, Alfonsi V, Bruni R, Busani L, Ciccaglione A, Medici D, et al. Ongoing outbreak of hepatitis A in Italy: preliminary report as of 31 May 2013. *Eurosurveillance*. 2013; 18.

50. Fournet N, Degee M, Urbanus A, Nichols G, Rosner B, Chalmers R, et al. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season. *Eurosurveillance*. 2012; 18.
51. Jennings P, Rhatigan A. *Cryptosporidiosis* outbreak in Ireland linked to public water supply. *Eurosurveillance*. 2002; 6.
52. Scarcella C, Carasi S, Cadoria F, Macchi L, Pavan A, Salamana M, et al. An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. *Eurosurveillance*. 2009; 14.
53. Palmera-Suarez, Garcia P, Garcia A, Barrasa A, Herrera D. *Salmonella Kottbus* outbreak in infants in Gran Canaria (Spain), caused by bottled water, August-November 2006. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2007; 12.
54. Shivaji T, Pinto S, Bento A, Serra L, Valente J, Machado J, et al. A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Eurosurveillance*. 2014.
55. Dege N. Technology of bottled water. 3ª edição. USA: Blackwell Publishing; 2011.
56. Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. World Health Organization. London: IWA Publishing; 2003.
57. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American journal of infection control*. 2006; 34:S20-8; discussion S64-73.
58. Paterson D. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc and Elsevier, Inc. 2006; 34.
59. Dada AC, Oluyeye J, Odeyemi A. Incidence of multiple antibiotic resistant Gram-negative bacteria isolated from surface and underground water sources in south western region of Nigeria. *Water Science & Technology—WST*. 2009.
60. Ferreira W, Sousa J, Amorim J, Bacellar F, Calado E, Ramos H. *Microbiologia - volume 2*. LIDEL. Lisboa; 2000.
61. Berrazeg M, Diene S, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. *PloS one*. 2013; 8.
62. Hayden MK, Lin MY, Lolans K, Weiner S, Blom D, Moore NM, et al. Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015; 60:1153-61.
63. Ud-Din AI, Wahid SU, Latif HA, Shahnaij M, Akter M, Azmi IJ, et al. Changing trends in the prevalence of *Shigella* species: emergence of multi-drug resistant *Shigella sonnei* biotype g in Bangladesh. *PloS one*. 2013; 8:e82601.
64. Xia S, Xu B, Huang L, Zhao JY, Ran L, Zhang J, et al. Prevalence and characterization of human *Shigella* infections in Henan Province, China, in 2006. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49:232-42.
65. Skariyachan S, Mahajanakatti AB, Grandhi NJ, Prasanna A, Sen B, Sharma N, et al. Environmental monitoring of bacterial contamination and antibiotic resistance patterns of the fecal coliforms isolated from Cauvery River, a major drinking water source in Karnataka, India. *Environmental monitoring and assessment*. 2015; 187:279.
66. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 2013; 26:822-80.
67. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013; 19:141-60.
68. Flores Ribeiro A, Bodilis J, Alonso L, Buquet S, Feuilloley M, Dupont JP, et al. Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *The Science of the total environment*. 2014; 490:370-8.
69. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2012; 25:2-41.
70. Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature reviews Microbiology*. 2009; 7:514-25.
71. Zhao Y, Niu W, Sun Y, Hao H, Yu D, Xu G, et al. Identification and characterization of a serious multidrug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strain in China. *BioMed research international*. 2015; 2015:580240.



72. Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, Dewavrin F, Tissier S, Diarra M, et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Critical care*. 2006; 10:R143.
73. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Maraki S, Levis P, Dimopoulou D, Spervovasilis NA, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. *PloS one*. 2012; 7:e37375.
74. Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51:1085-8.
75. Horsley A, Webb K, Bright-Thomas R, Govan J, Jones A. Can Early *Burkholderia cepacia* Complex Infection in Cystic Fibrosis be Eradicated with Antibiotic Therapy? *Front Cell Infect Microbiology*. 2011; 1.
76. Benedetti P, Rassu M, Pavan G, Sefton A, Pellizzer G. Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of *Myroides* infections. *Infection*. 2011; 39:161-5.
77. Dharne MS, Gupta AK, Rangrez AY, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS. Antibacterial activities of multi drug resistant *Myroides odoratimimus* bacteria isolated from adult flesh flies (Diptera: sarcophagidae) are independent of metallo beta-lactamase gene. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2008; 39:397-404.
78. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010; 74:417-33.
79. Leekha S, Terrell C, Edson R. General Principles of Antimicrobial Therapy. *Foundation for Medical Education and Research*. 2011; 86:156-67.
80. Kong K, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 2010; 118:1-36.
81. Sousa J. Manual de Antibióticos Antibacterianos – 2ª edição: Edições Fernando Pessoa; Porto; 2010.
82. Singh G. Beta-lactams in the new millennium. Part-I: monobactams and carbapenems. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4:69-92.
83. Tice A, Rehem S, Dalovisio J, Bradley J, Martinelli J, Graham D, et al. Practice Guidelines for Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy. *Infectious Diseases Society of America*. 2004; 38:1651-72.
84. Schneper L, Mathee K, Kong K. Beta-lactam Antibiotics. *Antibiosis to Resistance and Bacteriology*. 2010; 118:1-36.
85. Bertoncheli C, Hörner R. Uma revisão sobre metalo-β-lactamases. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008; 44.
86. Gralha R. Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas - estudo de revisão. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2011.
87. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54:969-76.
88. Tacão M, Moura A, Correia A, Henriques I. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Elsevier Science*. 2014; 48:100-7.
89. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001; 48 Suppl 1:59-64.
90. Rayamajhi N, Kang SG, Lee DY, Kang ML, Lee SI, Park KY, et al. Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type beta-lactamases from cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from swine. *International journal of food microbiology*. 2008; 124:183-7.
91. Oteo J, Perez-Vazquez M, Campos J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Current opinion in infectious diseases*. 2010; 23:320-6.
92. Brolund A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infection ecology & epidemiology*. 2014; 4.
93. Amador PP, Fernandes RM, Prudencio MC, Barreto MP, Duarte IM. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of class A and class C beta-lactamases. *Journal of environmental science and health Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*. 2015; 50:26-39.
94. Roy S, Datta S, Viswanathan R, Singh AK, Basu S. Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* causing neonatal septicemia (2007-10) and role of an efflux pump in tigecycline non-susceptibility. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013; 68:1036-42.

95. Malloy AM, Campos JM. Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011; 30:1092-3.
96. Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical microbiology reviews*. 2001; 14:933-51.
97. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*. 2011; 17:1791-8.
98. Mishra SK, Acharya J, Kattel HP, Koirala J, Rijal BP, Pokhrel BM. Metallo-beta-lactamase producing gram-negative bacterial isolates. *Journal of Nepal Health Research Council*. 2012; 10:208-13.
99. Brink AJ, Coetsee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *Journal of clinical microbiology*. 2013; 51:369-72.
100. Montezzi LF, Campana EH, Correa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva IL, et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *International journal of antimicrobial agents*. 2015; 45:174-7.
101. Rizvi M, Fatima N, Rashid M, Shukla I, Malik A, Usman A, et al. Extended spectrum AmpC and metallo-beta-lactamases in *Serratia* and *Citrobacter* spp. in a disc approximation assay. *Journal of infection in developing countries*. 2009; 3:177-86.
102. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009; 22:161-82, Table of Contents.
103. Pérez-Pérez F, Hanson D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40:2153-62.
104. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future microbiology*. 2007; 2:297-307.
105. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, Hanson ND, Thomson KS. Positive extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC beta-lactamases more often than to ESBLs. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48:673-4.
106. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *International journal of antimicrobial agents*. 2009; 34:340-2.
107. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S, Endimiani A, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47:294-9.
108. El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*. 2013; 39:113-22.
109. Oteo J, Miro E, Perez-Vazquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the global and national level: what should be expected in the future? *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2014; 32 Suppl 4:17-23.
110. Canton R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology*. 2011; 11:477-85.
111. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Macmillan Publishers Limited*. 2012; 486.
112. Morgan X, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLOS Computational Biology*. 2012; 8.
113. Willing B, Russell S, Finlay B. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews - Microbiology*. 2011; 9.
114. ERSAR. O tratamento de água para consumo humano face à qualidade da água de origem. Instituto Regulador de Águas e Resíduos e Laboratório Nacional de Engenharia Civil. 2009.
115. McKnight U, Rasmussen J, Kronvang B, Bjerg P, Binning P. Integrated assessment of the impact of chemical stressors on surface water ecosystems. *The Science of the total environment*. 2012; 427-428:319-31.
116. Monte H, Albuquerque. Reutilização de Águas Residuais. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos e Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. 2010.
117. Biyela P, Lin J, Bezuidenhout C. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Science & Technology—WST*. 2004; 50:45-50.

118. Huijbers P, Blaak H, de Jong MC, Graat EA, Vandenbroucke-Grauls CM, De Roda Husman AM. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: A review. *Environmental science & technology*. 2015.
119. INSA. Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. 2013; citado em 27/11/2013 do site: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx#amb>.
120. Yang CW, Chang YT, Chao WL, Shiung, II, Lin HS, Chen H, et al. An investigation of total bacterial communities, culturable antibiotic-resistant bacterial communities and integrons in the river water environments of Taipei city. *Journal of hazardous materials*. 2014; 277:159-68.
121. Recomendação ERSAR n.º 03/2010 - Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento. 2010; citado em 19/04/2015 do site: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=\Root\Contents\Sitio\MenuPrincipal\Documentacao\Publicacoesexternas&Section=MenuPrincipal&FolderPath=\Root\Contents\Sitio\MenuPrincipal\Documentacao&GenericContentId=o&BookID=2357>.
122. PA W. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. . *Clin Lab Standards Inst*. 2008:M100-S18.
123. Phillippe H, Darling C, Aikens G, Wargo K. Development of an antibiogram in a long-term care facility. *The Consultant pharmacist : the journal of the American Society of Consultant Pharmacists*. 2011; 26:829-36.
124. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS one*. 2015; 10:e0123690.
125. Dallenne C, Costa A, Decré´ D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 65:490-5.
126. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006; 57:154-5.
127. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011; 70:119-23.
128. Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 14:616-8.
129. Singh A, Shahid M, Sobia F, Umesh K. Comparative study on occurrence of class A and class C  $\beta$ -lactamase genes and their co-occurrence in Indian *Enterobacteriaceae* during years 2009 and 2010. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine - Elsevier*. 2011; 4:764-8.
130. D'Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacca R, Vailati F, et al. CMY-16, a novel acquired AmpC-type beta-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 50:618-24.
131. Pindi P, Yadav P, Shiva Shanker A. Identification of Opportunistic Pathogenic Bacteria in Drinking Water Samples of Different Rural Health Centers and Their Clinical Impacts on Humans. *BioMed research international*. 2013;1-10.
132. Zhang R, Ichijo T, Huang YL, Cai JC, Zhou HW, Yamaguchi N, et al. High prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes and environments / JSME*. 2012; 27:158-63.
133. MenezesI E, Medeiros do Nascimento K, Soares K, Amorim L, Neto J, Cunha F. Avaliação da atividade in vitro do meropenem contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro expandido isoladas na cidade de Fortaleza, Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007.
134. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infection control and hospital epidemiology*. 2009; 30:1180-5.
135. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010; 65:1119-25.
136. Metri BC, Jyothi P, Peerapur BV. Antibiotic resistance in *Citrobacter* spp. isolated from urinary tract infection. *Urology annals*. 2013; 5:312-3.
137. Davin-Regli A, Pages JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:392.

138. Hsu WB, Wang JH, Chen PC, Lu YS, Chen JH. Detecting low concentrations of *Shigella sonnei* in environmental water samples by PCR. *FEMS microbiology letters*. 2007; 270:291-8.
139. Yetkin G, Ay S, Kayabas U, Gedik E, Gucluer N, Caliskan A. [A pneumonia case caused by *Cedecea lapagei*]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2008; 42:681-4.
140. Lopez LA, Ibarra BS, de la Garza JA, Rada Fde J, Nunez AI, Lopez MG. First reported case of pneumonia caused by *Cedecea lapagei* in America. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013; 17:626-8.
141. Bicudo E, Macedo V, Carrara M, Castro F, Rage R. Nosocomial Outbreak of *Pantoea agglomerans* in a Pediatric Urgent Care Center. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2007; 11:281-4.
142. Cabral JP. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7:3657-703.
143. Sanchez MB, Decorosi F, Viti C, Oggioni MR, Martinez JL, Hernandez A. Predictive Studies Suggest that the Risk for the Selection of Antibiotic Resistance by Biocides Is Likely Low in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS one*. 2015; 10:e0132816.
144. Sanchez MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:658.
145. Xun M, Zhang Y, Li BL, Wu M, Zong Y, Yin YM. Clinical characteristics and risk factors of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a hospital in northwest China. *Journal of infection in developing countries*. 2014; 8:1000-5.
146. Vermis K, Brachkova M, Vandamme P, Nelis H. Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. *Systematic and applied microbiology*. 2003; 26:595-600.
147. Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, Hirata Mde L, Saltini DA, Caetano VC, et al. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. *Journal of medical microbiology*. 2004; 53:999-1005.
148. Cho SH, Chae SH, Im WT, Kim SB. *Myroides marinus* sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011; 61:938-41.
149. Wong V, Levi K, Baddal B, Turton J, Boswell T. Spread of *Pseudomonas fluorescens* Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:2093-6.
150. Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *International journal of antimicrobial agents*. 2000; 14:137-42.
151. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*. 2007; 115:1400-8.
152. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45:1167-74.
153. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50:3115-8.
154. Tan TY, Ng LS, He J, Chen DM. Improved detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* using new susceptibility breakpoints for third-generation cephalosporins. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011; 70:423-4.
155. Navaneeth BV. Extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a rural South Indian tertiary care hospital. *International journal of antimicrobial agents*. 2007; 29:602-3.
156. Pitout JD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 16:165-70.
157. Dong F, Xu XW, Song WQ. [Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated in children]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2010; 90:2723-5.
158. Hanson ND, Moland ES, Hong SG, Propst K, Novak DJ, Cavalieri SJ. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52:3814-6.

## VII. Anexos

**Tabela de padronização com a** medição dos halos de inibição utilizando as normas descritas no ‘*Clinical Laboratory Standards Institute*’ (CLSI) para as *Enterobacteriaceae*.

Antibiótico	Resistente (mm)	Intermédio (mm)	Sensível (mm)
AML	≤13	14–16	≥17
AUG	≤13	14–17	≥18
FOX	≤14	15–17	≥18
FEP	≤18	19–24	≥25
CAZ	≤17	18–20	≥21
CTX	≤22	23–25	≥26
IMI	≤19	20–22	≥23
CIP	≤15	16–20	≥21
ATM	≤17	18–20	≥21
ERTA	≤18	19–21	≥ 22
MERO	≤19	20–22	≥23
DORI	≤19	20–22	≥23
CN	≤12	13–14	≥15
AK	≤14	15–16	≥17
TOB	≤12	13–14	≥15
TE	≤11	12–14	≥15
C	≤14	15–16	≥17
FOS	≤12	13–15	≥16
F	≤12	13–17	≥18
TGC*	≤14	15–17	≥18
SXT	≤10	11–15	≥16

\*EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**Tabela - Análise estatística da suscetibilidade das bactérias isoladas aos antibióticos**

	Nº de isolados (%)			
Antibióticos	Sensível	Intermédio	Resistente	Total (número de isolados)
Aminopenicilinas				
Ampicilina (AML)	4,2	4,2	91,7	24
Cefalosporinas de 2ª. Geração				
Cefoxitina (FOX)	29,2	0	70,8	24
Cefalosporinas de 3ª geração				
Cefotaxima (CTX)	12,5	16,7	70,8	24
Ceftazidima (CAZ)	37,5	20,8	41,7	24
Cefalosporinas de 4ª geração				
Cefepima (FEP)	95,8	4,2	0	24
Carbapenemos				
Meropenem	72,7	9,1	18,2	11
Ertapenem	61,5	30,8	7,7	13
Imipenem	79,2	16,7	4,2	24
Doripenem	63,7	9,1	27,3	11
Quinolonas				
Ciprofloxacina (CIP)	85,7	14,3	0	14
Aminoglicosídeos				
Gentamicina (CN)	100	0	0	11
Amicacina (AK)	90,9	9,1	0	11
Cloranfenicol e tetraciclinas				
Cloranfenicol (C)	90,9	9,1	0	11
Tetraciclina (TE)	81,8	9,1	9,1	11
Sulfonamidas e suas associações				
Sulfametoxazol + Trimetoprim (STX)	100	0	0	11

Outros $\beta$ -lactâmicos				
Amoxicilina e ácido clavulânico (AUG)	12,5	12,5	75	24
Tigeciclina (TGC)*	90,9	9,1	0	11
Tobramicina (TOB)	90,9	0	9,1	11
Fosfomicina (FOS)	81,8	9,1	9,1	11
Aztreonam (ATM)	58,3	20,8	20,8	24
Nitrofurantoína (F)	90,9	9,1	0	11

**Tabela - Avaliação das suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias não *Enterobacteriaceae***

	Nº de isolados (%)			
Antibióticos	Sensível	Intermédio	Resistente	Total (número de isolados)
Aminopenicilinas				
Ampicilina (AML)	0	0	100	7
Cefalosporinas de 2ª. Geração				
Cefoxitina (FOX)	14,3	0	85,7	7
Cefalosporinas de 3ª geração				
Cefotaxima (CTX)	28,6	0	71,4	7
Ceftazidima (CAZ)	42,9	14,3	42,9	7
Cefalosporinas de 4ª geração				
Cefepima (FEP)	28,6	14,3	57,1	7
Carbapenemos				
Meropenem	16,7	16,7	66,7	6
Ertapenem	16,7	0	83,8	6
Imipenem	28,6	0	71,4	7
Doripenem	16,7	0	83,3	6
Quinolonas				
Ciprofloxacina (CIP)	83,3	16,7	0	6
Aminoglicosídeos				
Gentamicina (CN)	66,7	16,7	16,7	6
Amicacina (AK)	66,7	16,7	16,7	6
Cloranfenicol e tetraciclinas				
Cloranfenicol (C)	33,3	0	66,7	6
Tetraciclina (TE)	83,3	16,7	0	6
Sulfonamidas e suas associações				
Sulfametoxazol + Trimetoprim (STX)	83,3	16,7	0	6
Outros β-lactâmicos				
Amoxicilina e ácido clavulânico (AUG)	0	0	100	7
Tigeciclina (TGC)*	83,3		16,7	6
Tobramicina (TOB)	83,3	16,7	0	6
Fosfomicina (FOS)	66,7	0	33,3	6
Aztreonam (ATM)	28,6	0	71,4	7
Nitrofurantoína (F)	50	0	50	6